

# **Die Bedeutung der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalgebung für epigenetische Veränderungen während der Transformation von Speicheldrüsen-Stammzellen zu Krebsstammzellen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalis (Dr. rer. nat.)  
im Promotionsfach Biologie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin

angefertigt von Dipl. Ernährungswissenschaftler Peter Wend  
geboren am 12.08.1976 in Bautzen

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. Prof. W. Birchmeier  
2. Prof. H. Saumweber  
3. Prof. T. Sommer

eingereicht: 15.12.2009

Tag der mündlichen Prüfung: 23.04.2010

## Abstract (Deutsch)

Neueste Arbeiten zeigen, dass die Selbsterneuerung und Pluripotenz von Stammzellen durch hochkonservierte Signalwege kontrolliert werden. Störungen dieser Prozesse verursachen Tumoren, die von Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften ausgehen, den sog. Krebsstammzellen. Diese Arbeit zeigt, dass erhöhte Wnt/ $\beta$ -Catenin- und erniedrigte Bmp-Signalgebung eine wichtige Rolle in der Entstehung humaner Plattenepithel-Karzinome der Speicheldrüsen spielen. Es wurde ein Mausmodell hergestellt, bei dem die Aktivierung der Wnt/ $\beta$ -Catenin- und der Verlust der Bmp-Signalgebung ebenfalls Speicheldrüsenkarzinome verursachen. Die Speicheldrüsen-Tumoren der Maus enthielten eine erhöhte Zahl von CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Stammzellen, von denen bereits 500 Zellen transplantierbare Tumoren in NOD/SCID-Mäusen induzierten, d. h. dass sie Krebsstammzellen darstellen. Die Veränderung nur eines Signalweges, Wnt/ $\beta$ -Catenin oder Bmp allein, war nicht tumorigen, resultierte aber in einer erhöhten Anzahl von CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Stammzellen in der Speicheldrüse und einer fünffach schnelleren Geweberegeneration nach Verwundung. Die Krebsstammzellen der Speicheldrüsen zeigten eine erhöhte Expression von Pluripotenzgenen und globale Veränderungen von trimethyliertem Lysin 4 und 27 des Histons 3. Diese Veränderungen können häufig mit einer Zunahme aktiven und einer Abnahme repressiven Chromatins korreliert werden. Die Krebsstammzellen wuchsen *in vitro* als undifferenzierte Salisphären und konnten durch Inhibierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges in drüsenartige Strukturen differenziert werden. Dieser Prozess war von repressivem Chromatin abhängig, da DNA-Methylierungs- oder Histon-Deazetylase-Inhibitoren den ursprünglichen Krebsstammzell-Status wieder reaktivieren konnten. Diese Arbeit zeigt, dass ein aktiver Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg die Transformation von normalen Stammzellen zu Krebsstammzellen durch einen epigenetischen Mechanismus fördert. Die Ergebnisse eröffnen neue Strategien für die Tumorthherapie beim Menschen.

Wnt/beta-Catenin, BMP, Krebs, Stammzellen, Epigenetik, Regeneration

## **Abstract (English)**

Little is known about the processes by which cancer stem cells arise in the different tissues. Our analysis of aggressive squamous cell carcinomas (SCCs) of the salivary gland in human patients suggested a link to the Wnt/ $\beta$ -catenin and Bmp signaling systems. Using a genetically modified mouse strain in which Wnt signaling is up-regulated and Bmp is suppressed, we found that Wnt/ $\beta$ -catenin promotes the transformation of normal stem cells into cancer stem cells through an epigenetic mechanism. Mouse SCCs of the salivary gland contained high numbers of CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup> cancer stem cells. As few as 500 of these cells sufficed to cause tumors when transplanted into NOD/SCID mice. Mice in which only one of the signaling systems was altered had higher numbers of stem cells in the salivary gland, more efficient tissue regeneration, and no apparent tumors. We discovered that the difference of normal compared to cancer stem cells in the salivary gland is an up-regulation of specific pluripotency genes, e.g. Dppa5, as well as global changes in trimethylated Lysine 4 and 27 of histone 3. This indicates an increase of active chromatin and a decrease in the repressive form, which suggests a mechanistic explanation for the change of cell fate. Cancer stem cells of the salivary gland grew as non-adherent spheres and retained the capacity for differentiation if  $\beta$ -catenin is inhibited. This depended on repressive chromatin, as shown by the fact that 5-azacytidine or HDAC inhibitors restored stemness. Our data opens new strategies for future cancer therapies in humans.

Wnt/beta-catenin, BMP, cancer, stem cells, epigenetics, regeneration

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Walter Birchmeier am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC) in Berlin-Buch angefertigt.



## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>8</b>
<b>Einleitung .....</b>	<b>9</b>
Stammzellen - Ein Überblick .....	9
Epigenetische Regulationsmechanismen in Stammzellen .....	12
Der Wnt-Signaltransduktionsweg .....	13
Der kanonische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktionsweg .....	14
Die Bedeutung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges während der Embryonalentwicklung sowie in Regeneration und Tumorentstehung .....	17
Der Tgf- $\beta$ /Bmp-Signaltransduktionsweg .....	20
Der Bmp-Signaltransduktionsweg .....	20
Die Bedeutung des Bmp-Signalweges in der Embryonalentwicklung sowie in Regeneration und Tumorentstehung .....	23
Die Bedeutung der Speicheldrüsen und ihre Entwicklung .....	25
Speicheldrüsentumoren und Therapieformen .....	29
Zielstellung dieser Arbeit .....	30
<b>Ergebnisse .....</b>	<b>31</b>
Humane Speicheldrüsen-Karzinome zeigen Deregulierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin- und Bmp-Signalweges .....	31
Herstellung eines Mausmodells für Plattenepithel-Karzinome der Speicheldrüse .....	32
Tumorentstehung in Speicheldrüsen von Mäusen mit verstärktem Wnt/ $\beta$ -Catenin- und gehemmten BmpRIa-Signalweg .....	35
Genexpressionsanalyse von einfach- und doppelt-mutanten Speicheldrüsen .....	37
Identifizierung von Krebsstammzellen in Plattenepithel-Karzinomen der Speicheldrüsen .....	39
Die Krebsstammzellen aus doppelt-mutanten Speicheldrüsen exprimieren Pluripotenz-Gene .....	41
Das Chromatin der Krebsstammzellen zeigt ein spezifisch verändertes Methylierungsmuster .....	44
Speicheldrüsen-Krebsstammzellen wachsen in vitro als Salisphären: Effekt von Wnt/ $\beta$ -Catenin-, HDAC- und DNA-Methylierungs-Inhibitoren .....	45

Die Wnt/ $\beta$ -Catenin- und Bmp-Signalgebung in den Stammzellen der Speicheldrüse während der Entwicklung der Maus.....	49
Die Bedeutung der Wnt/ $\beta$ -Catenin- und Bmp-Signalgebung während der Regeneration der Speicheldrüse .....	52
<b>Diskussion .....</b>	<b>55</b>
Gemeinsamkeiten in Speicheldrüsen-Karzinomen von Mensch und Maus .....	55
Die CD24 <sup>+</sup> CD29 <sup>+</sup> -Zellen in den Speicheldrüsen-Tumoren der Maus sind Krebsstammzellen .....	57
Krebsstammzellen zeigen ES-Zell-Charakteristika und einen veränderten Histon-Code .....	59
Die Wnt/ $\beta$ -Catenin- und Bmp-Signalwege sind auch in der Entwicklung der Speicheldrüse von Bedeutung.....	62
Wnt/ $\beta$ -Catenin- und Bmp-Signalgebung in der Regeneration der Speicheldrüse .....	63
Das Verständnis der regenerativen Prozesse in der Speicheldrüse ermöglicht neue therapeutische Anwendungen.....	65
Relevanz dieser Arbeit .....	67
<b>Material und Methoden .....</b>	<b>69</b>
Molekularbiologische Standardmethoden, Kits und Chemikalien .....	69
Verwendete Geräte .....	69
Bakterienstamm .....	70
Antikörper und cDNAs .....	70
Verwendete Mauslinien und deren Genotypisierung .....	70
RNA-Isolierung .....	71
cDNA-Synthese und quantitative PCR .....	72
Microarray-Analyse .....	72
Immunhistologische Methoden.....	75
Vorbereitung von Paraffin-Schnitten .....	75
Herstellung von Gefrierschnitten.....	75
Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung auf Paraffinschnitten .....	75
Immunofärbungen.....	76
<i>In-situ</i> -Hybridisierung .....	76
Beta-Galactosidase-Färbung .....	77
Elektronenmikroskopie .....	78

---

Biochemische Methoden .....	78
Histon-Extraktion aus Säugerzellen .....	78
SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse .....	79
Zellbiologische Methoden .....	80
Kultivierung von Zellen .....	80
Bestimmung der Zellproliferation .....	80
Nicht-adhärenz Kultivierung von Sphären .....	80
Präparation von Zellen für FACS-Analyse und Zytozentrifugation .....	81
Versuchstiere .....	83
Regenerations-Experiment .....	83
Transplantation von Tumorzellen in NOD/SCID-Mäuse .....	83
Humane Tumorproben .....	84
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>85</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>87</b>
<b>Publikationsliste .....</b>	<b>117</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>118</b>
<b>Erklärung .....</b>	<b>119</b>

## Zusammenfassung

Neueste Arbeiten haben gezeigt, dass die Selbsterneuerung und Pluripotenz von Stammzellen durch hochkonservierte Signalwege kontrolliert werden. Störungen dieser Prozesse verursachen Tumoren, die von Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften ausgehen, den sog. Krebsstammzellen. Diese Arbeit gliedert sich in zwei Teile. In einem ersten Teil wird gezeigt, dass erhöhte Wnt/ $\beta$ -Catenin- und erniedrigte Bmp-Signalgebung eine wichtige Rolle in der Entstehung humaner Plattenepithel-Karzinome der Speicheldrüsen spielen. Wir haben ein Mausmodell hergestellt, bei dem die Aktivierung der Wnt/ $\beta$ -Catenin- und der Verlust der Bmp-Signalgebung ebenfalls Speicheldrüsenkarzinome verursachen. Die Speicheldrüsen-Tumoren der Maus enthielten eine erhöhte Zahl von CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Stammzellen (10%), von denen bereits 500 Zellen ausreichten, um transplantierbare Tumoren in NOD/SCID-Mäusen zu induzieren, d. h. dass sie Krebsstammzellen darstellen. Die Veränderung nur eines Signalweges, Wnt/ $\beta$ -Catenin oder Bmp allein, war nicht tumorigen, resultierte aber in einer erhöhten Anzahl von CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Stammzellen in der Speicheldrüse (3%) und einer fünffach schnelleren Geweberegeneration nach Verwundung. In einem zweiten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, welcher Mechanismus für den Übergang von normalen Gewebe-Stammzellen zu Krebsstammzellen verantwortlich ist. Die Krebsstammzellen der Speicheldrüsen zeigten eine erhöhte Expression von Pluripotenzgenen sowie globale Veränderungen von trimethyliertem Lysin 4 und 27 des Histons 3 im Chromatin. Diese Veränderungen können häufig mit einer Zunahme aktiven und einer Abnahme repressiven Chromatins in Verbindung gebracht werden. Die Krebsstammzellen wuchsen *in vitro* als nichtadhärente, undifferenzierte Aggregate (sog. Salisphären) und konnten durch chemische Inhibierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges mit der Substanz ICG-001 in drüsenartige Strukturen differenziert werden. Dieser Prozess war von repressivem Chromatin abhängig, da DNA-Methylierungs- (5-Azazytidin) oder Histon-Deazetylase-Inhibitoren (Valproinsäure) den ursprünglichen Krebsstammzell-Status wieder reaktivieren konnten. Diese Arbeit zeigt, dass ein aktiver Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg die Transformation von normalen Stammzellen zu Krebsstammzellen durch einen epigenetischen Mechanismus fördert. Die Ergebnisse eröffnen neue Strategien für die Tumorthherapie beim Menschen.

## Einleitung

### ***Stammzellen - Ein Überblick***

Stammzellen sind Körperzellen, die sich in verschiedene Zelltypen oder Gewebe ausdifferenzieren können. Die Unterscheidung von Stammzellen erfolgt meist anhand ihres ontogenetischen Alters und Differenzierungspotentials, wobei embryonale Stamm (ES)-Zellen die frühesten Stammzellen darstellen. Aus diesen gehen später die primitiven Keimstammzellen, die somatischen Stammzellen und die Vorläuferzellen verschiedener Gewebe hervor. Stammzellen besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Generierung sich differenzierender Zellen. Dazu teilen sich Stammzellen oft asymmetrisch, wobei eine neue Stammzelle und eine sich ausdifferenzierende Vorläuferzelle entstehen. Zur numerischen Zunahme durchlaufen Stammzellen eine symmetrische Teilung, wobei die Balance zwischen symmetrischer und asymmetrischer Teilung v. a. vom entwicklungsbiologischen Stadium und von Umwelteinflüssen abhängt [1].

Embryonale Stammzellen, die man aus der inneren Zellmasse der Blastozyste von Vertebraten isoliert, können sich in Zellen aller drei Keimblätter (Ektoderm, Entoderm und Mesoderm) sowie in Keimbahn-Zellen differenzieren. Man bezeichnet sie daher als pluripotent. Theoretisch sollten ES-Zellen eine unbegrenzte Quelle für regenerative Therapien darstellen. In der Praxis konnten ES-Zellen bisher jedoch nicht erfolgreich in klinischen Studien eingesetzt werden, da die Kontrolle von Proliferation und Differenzierung schwierig ist. Die größte Gefahr birgt das tumorigene Potential der ES-Zellen, die nach Transplantation Teratome bilden können. Es ist inzwischen aber gelungen, ausdifferenzierte Fibroblasten in sog. induzierte pluripotente Stammzellen (engl.: „induced pluripotent stem cells“, iPS) zu reprogrammieren [2,3].

Adulte Stammzellen, auch als somatische oder Gewebe-Stammzellen bezeichnet, besitzen nur ein beschränktes Differenzierungs-Potential für bestimmte Gewebe oder Organe, z. B. der Haut, der Leber oder des hämatopoetischen Systems. Im Unterschied zu ES-Zellen bezeichnet man Gewebe-Stammzellen als multipotent. Die hämatopoetischen Stammzellen des

Knochenmarks wurden bisher am besten untersucht. In den 1960er Jahren wurde gezeigt, dass Mäuse, die einer lethalen Dosis an  $\gamma$ -Strahlung ausgesetzt waren, mit einer Knochenmarks-Transplantation überleben [4,5]. Die erste Knochenmarks-Transplantation zur erfolgreichen Behandlung von Leukämie beim Menschen wurde 1965 durchgeführt [6]. Seitdem wurden in vielen weiteren Organen adulte Stammzellen identifiziert, die die Grundlage stammzell-basierter Therapien für Erkrankungen sind, z. B. bei Herzinfarkt, Parkinson oder Diabetes.

Typische Stammzell-Eigenschaften können auch Krebszellen zugeordnet werden, weshalb man diese als Krebs-Stammzellen (engl.: „cancer stem cells“, „tumor-initiating cells“) bezeichnet. Solche Eigenschaften sind die Fähigkeit zur nahezu unbegrenzten Selbsterneuerung und Differenzierung sowie die Abhängigkeit von einer bestimmten zellulären Umgebung, der (Krebs-) Stammzell-Nische [7,8,9]. So besitzen nur wenige Zellen eines Tumors tumorigenes Potential, wohingegen die Masse des Tumors aus differenzierten, nicht oder schwach tumorigenen Zellen besteht. Die Existenz von Krebsstammzellen wurde zuerst 1994 im hämatopoetischen System gezeigt [10]. Inzwischen wurden Krebsstammzellen ebenso in soliden Tumoren identifiziert, z. B. in Tumoren der Milchdrüse, des Gehirns, der Haut und des Darms [11,12,13,14]. In den letzten Jahren wurde zudem klar, dass Stamm- und Krebsstamm-Zellen charakteristische Genexpressions-Profile besitzen, die teils überlappen und woraus sich Prognosen zur Tumor-Differenzierung und Aggressivität ableiten lassen [15]. Außerdem wurde gezeigt, dass die Genexpression in diesen Zellen durch spezifische epigenetische Mechanismen reguliert wird [16,17].

In der Stammzell-Forschung sind bisher erst wenige allgemein-gültige Marker für ES-, Gewebe- oder Krebsstammzellen charakterisiert worden. Bisher erlaubten v. a. histologische und genetische Analysen die Identifizierung von Stammzell-Markern, wie Sca-1, CD133, Lgr5, CD24 und CD29. Diese Marker werden für die Isolierung von Gewebe- oder Krebsstammzellen verwendet, wobei einige organspezifisch sind und andere in verschiedenen Geweben gleichzeitig exprimiert werden (Tab. 1). Da kein alleiniger Marker für Stammzellen existiert,

kombiniert man üblicherweise mehrere Marker zu deren Identifizierung und Isolierung [18,19].

**Tab. 1: Häufige Marker zur Identifizierung von ES-, Gewebe- oder Krebsstammzellen [14,18,19,20,21].**

Marker	Synonym	Marker-Vorkommen (Beispiele)
SSEA-1	CD15	ES-, iPS- und Keimzellen; Krebsstammzellen (Gehirn)
Sca-1	„stem-cell antigen“, Ly-6A/E	Stammzellen in Muskeln, Milchdrüsen und im Hämatopoetischen System; Krebsstammzellen in Milchdrüse und Prostata
c-Kit	CD117	Hämatopoetische Stammzellen
CD24	„heat-stable antigen“	Stammzellen der Milch- und Speicheldrüse, Krebsstammzellen der Milchdrüse und Prostata
CD29	$\beta$ 1-Integrin	Stammzellen in Haarfollikeln, Milch- und Speicheldrüse; Krebsstammzellen der Milchdrüse
CD34		Hämatopoetische und Haarfollikel-Stammzellen, Epidermale Krebsstammzellen
CD133	Prominin-1	Neuroepitheliale, hämatopoetische und endotheliale Vorläuferzellen; Krebsstammzellen in Gehirn, Pankreas, Lunge, Prostata und Kolon
Lgr5	Gpr49	Stammzellen im Darm und Haarfollikeln, Krebsstammzellen im Kolon
p63		Krebsstammzellen der Prostata, verstärkt exprimiert in regenerativen Zellen vieler Epithelien
CD44	PGP1	Krebsstammzellen in Milchdrüse, Pankreas und in Tumoren der Kopf- und Hals-Region
CD49f	$\alpha$ 6-Integrin	Krebsstammzellen der Prostata

## **Epigenetische Regulationsmechanismen in Stammzellen**

Nach neuesten Ergebnissen korrelieren Selbsterneuerung und Pluripotenz von ES-Zellen eng mit dem epigenetischen Status [17,22]. Dies gilt auch für Krebsstammzellen [16]. Der Begriff „Epigenetik“ bezieht sich auf vererbare Modifikationen in der Zelle, die selbst nicht in der DNA-Sequenz kodiert sind. Epigenetische Phänomene können u. a. durch Modifikationen einzelner DNA-Basen oder der Histone vermittelt werden. Die bei weitem bekanntesten Modifikationen sind Methylierungen von Cytidin-Basen in Cytosin-Guanosin-Nukleotid-Dimeren (CpG). Außerdem findet man bestimmte Histon-Modifikationen, wie z. B. Acetylierungen oder Methylierungen an Lysinresten, die insgesamt auch als „Histon-Code“ bezeichnet werden. Sowohl DNA-Methylierungen als auch Histon-Modifikationen können gleichzeitig stattfinden und sich beeinflussen. Dadurch entstehen komplexe epigenetische Netzwerke, die bisher nur wenig erforscht sind [23].

Histon-Modifikationen können die Chromatinstruktur verändern. Dadurch ergeben sich Auswirkungen auf die Erreichbarkeit von Promotoren für Transkriptionsfaktoren, wodurch die Genaktivität beeinflusst wird. Ein charakteristischer Chromatin-Status, der mit repressivem Chromatin und transkriptioneller Inaktivität einhergeht, ist die dreifache Methylierung von Lysin an der Position 9 und 27 des Histons 3 (H3K9me3 und H3K27me3) [24,25]. Ein weiterer wichtiger Chromatin-Marker, H3K4me3, ist dagegen typisch für geöffnetes Chromatin, was mit aktivierten Promotoren assoziiert werden kann [24,26]. Einige Studien konnten zeigen, dass die Differenzierung von ES-Zellen und der Verlust von Pluripotenz typischerweise mit einem Anstieg von H3K9me3 und H3K27me3 korreliert. Dagegen werden die H3K4me3-Markierungen in diesen Zellen verringert [22]. Bisher ist wenig bekannt, ob und welche Chromatinmodifizierungen in Krebsstammzellen eine wichtige Rolle spielen.



Stammzellen werden in ihrer Funktion maßgeblich durch verschiedene Signalwege reguliert, wie Wnt, Tgf- $\beta$ /Bmp, Hedgehog, Notch und die Rezeptor-Tyrosinkinasen [27]. Im Folgenden werden zwei dieser Signalwege, Wnt/ $\beta$ -Catenin und Bmp, aufgrund ihrer großen Bedeutung für diese Arbeit näher erläutert.

### ***Der Wnt-Signaltransduktionsweg***

Der Wnt-Signaltransduktionsweg übernimmt eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung sowie während der Regeneration von Geweben und Organen im adulten Organismus. Störungen in solch wichtigen Signalwegen können auch zur Entstehung von Krankheiten und der Progression von Tumoren führen. Die Rolle des Wnt-Signalweges wurde erstmals durch Analysen in *Drosophila* und in der Maus verdeutlicht. So wurde 1982 das Gen *Int-1* (*Integrator-1*) gefunden und kloniert, das durch die Integration eines Retrovirus (Mouse Mammary Tumor Virus, MMTV) aktiviert wird und in Mäusen Tumoren der Milchdrüsen induziert [28]. 1973 wurde bereits die *Drosophila*-Mutante Wingless (*wg*) [29] durch eine stark gestörte embryonale Flügelentwicklung charakterisiert. Später zeigte sich, dass *wg* und *Int-1* Homologe darstellen [30,31]. Seitdem wird die Abkürzung „Wnt“ als Kombination der Gen-Namen *Wingless* aus *Drosophila* und *Int-1* aus der Maus verwendet [32]. Zusätzlich zum Verlust der Flügel offenbarte die *wg*-Mutante auch Segmentierungsstörungen während der Embryonalentwicklung [33]. Nüsslein-Volhard, Wieschaus, Perimon, Nusse und andere entdeckten weitere, durch mutierte Segmentpolaritäts-Gene verursachte Segmentierungsstörungen in *Drosophila*. Diese Gene konnten später als wichtige Komponenten in den Wnt-Signaltransduktionsweg eingeordnet werden [33,34,35,36].

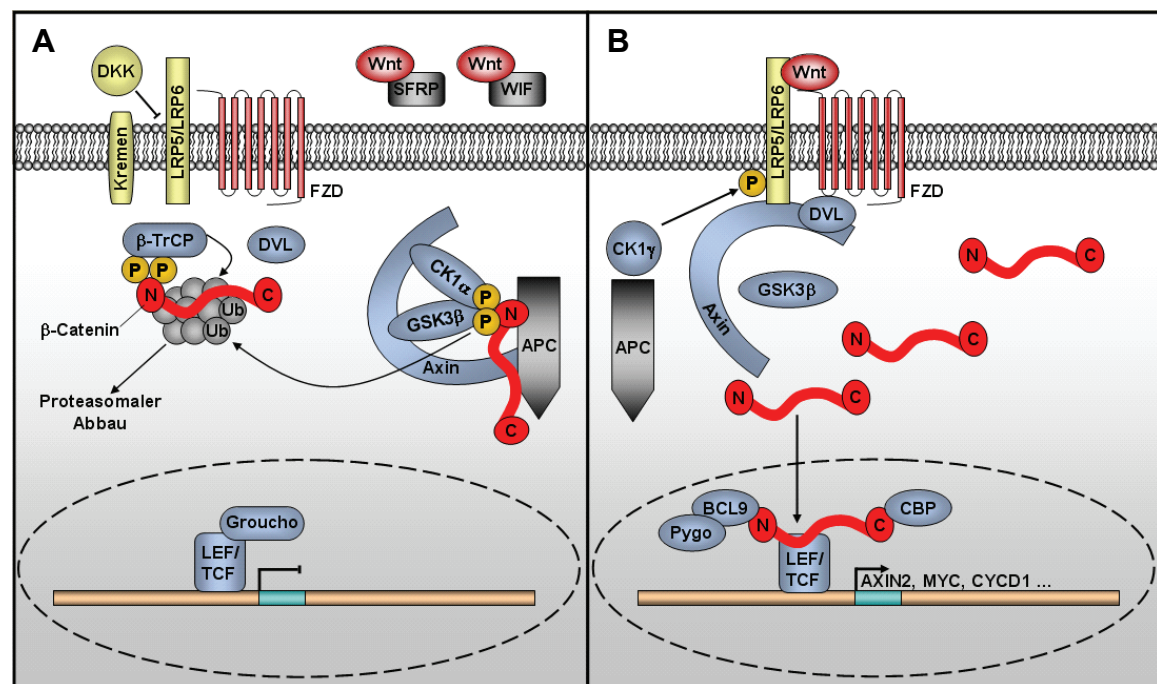
Wnt-Proteine sind cysteinreiche Glykoproteine, die parakrin auf lokal benachbarte Zellen wirken [37]. Nach ihrer Synthese werden die Wnt-Proteine zunächst schrittweise modifiziert (Palmitoylierung und Glykosylierung durch Porcupin). Anschließend erfolgen der Transport und die Sekretion der modifizierten Wnt-Proteine vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran über Wntless, wobei das

Recycling von Wntless durch den Retromer-Komplex übernommen wird [38,39,40,41,42,43,44,45,46,47]. Die sezernierten Wnt-Proteine können auf benachbarte Zellen als Liganden an die extrazelluläre N-terminale Domäne von Frizzled-Siebentransmembran-Rezeptoren binden und dadurch die Signalübertragung im Zytoplasma einleiten [48,49,50]. Die Bindung der verschiedenen Wnt-Liganden an die Frizzled-Rezeptoren kann entweder den klassischen, kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin- oder die nichtkanonischen, planaren Zellpolaritäts-(Wnt/JNK) oder Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwege initiieren. Dies deutet darauf hin, dass die Familie der Wnt-Proteine (es existieren 19 humane *Wnt*-Gene) zumindest in zwei Gruppen unterteilt werden kann. Die ektopische Expression von z. B. Wnt-1, -3a, -6, -8a resultiert in einer transformierenden (onkogenen) Wirkung auf epitheliale Zellen sowie der Induktion einer sekundären Körperachse in *Xenopus*-Embryonen durch die vorwiegende Aktivierung des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges. Zur zweiten Gruppe gehören die nichtkanonischen Wnt-Liganden (z. B. Wnt-4, -5a, -11), welche Zellpolarität sowie gerichtete Zellbewegungen in *Drosophila*- und *Xenopus*-Embryonen kontrollieren, die auch als Konvergenz- und Extensions-Bewegungen bekannt sind [51,52]. Da in dieser Arbeit die Bedeutung des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges untersucht wurde, soll dieser nun detaillierter beschrieben werden.

### **Der kanonische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktionsweg**

Im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg übernimmt das durch das Gen *Ctnnb1* (catenin beta 1) kodierte  $\beta$ -Catenin-Molekül in der Zelle eine duale Funktion. Zum einen aktiviert es nach Stabilisierung und Translokation in den Zellkern spezifische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Zielgene (Abb. 1). Zum anderen ist  $\beta$ -Catenin mit Cadherin-Zelladhäsionsmolekülen assoziiert und gehört zur Armadillo-Familie, da es zwölf sich wiederholende Armadillo-Motive besitzt. Diese Domänen wurden erstmals im *Drosophila*-Segmentpolaritätsgen und  $\beta$ -Catenin-Homolog *armadillo* nachgewiesen [53,54,55,56,57,58,59]. Die Aktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges ist v. a. von der Stabilität des  $\beta$ -Catenin-Moleküls abhängig [60,61,62]. In Abwesenheit von Wnt-Liganden (Abb. 1A) wird zytoplasmatisches  $\beta$ -Catenin in einen Multiprotein-Komplex rekrutiert. Dort interagiert  $\beta$ -Catenin mit dem Tumor-Suppressor-Genprodukt Adenomatous Polyposis Coli (APC) sowie

Axin1/Axin2 wird durch zwei Kinasen (Caseinkinase 1 $\alpha$ , CK1 $\alpha$  und Glykogensynthasekinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ ) N-terminal phosphoryliert (an Serin 45, Threonin 41, Serin 37 und Serin 33) [63,64,65,66,67,68,69,70]. Phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin bindet danach an  $\beta$ -TrCP ( $\beta$ -transducin repeat-containing protein), wird in einem E3-Ubiquitin-Ligasen-Komplex poly-ubiquitiniert und für den proteasomalen Abbau markiert [71,72,73,74]. Durch den streng kontrollierten Abbau von überschüssigem zytoplasmatischem  $\beta$ -Catenin wird der



**Abb. 1: Der Wnt/β-Catenin-Signalweg.** (A) In Abwesenheit von Wnt-Liganden wird zytoplasmatisches β-Catenin in einen Multiproteinkomplex aus Axin und APC rekrutiert und von CK1 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  N-terminal phosphoryliert. Die E3-Ubiquitinligase β-TrCP ubiquitiniert N-terminal phosphoryliertes β-Catenin und vermittelt den proteasomalen Abbau. Im Zellkern verhindern Groucho-Ko-Repressoren die Transkription von LEF/TCF-Zielgenen. (B) Nach Bindung von Wnt an FZD und LRP5/6-Ko-Rezeptoren startet die Signalübertragung auf β-Catenin. CK1 $\gamma$  und GSK3 $\beta$  phosphorylieren LRP5/6. Dishevelled-Polymere interagieren mit FZD. Axin wird an die Plasmamembran rekrutiert, was den Multiprotein-Abbaukomplex inaktiviert. Freies, stabilisiertes β-Catenin transloziert in den Zellkern und bildet einen transkriptionell aktiven Komplex mit LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren. Die Bindung zu Groucho wird aufgehoben und die Bindung an Ko-Aktivatoren wie BCL9, Pygo und CBP initiiert. APC, adenomatous polyposis coli; β-TrCP, β-transducin repeat-containing protein; BCL9, B-cell lymphoma 9; CBP, CREB binding protein; CK1 $\alpha/\gamma$ , Casein kinase 1 $\alpha/\gamma$ ; DKK, Dickkopf; DVL, Dishevelled; GSK-3 $\beta$ , Glykogensynthase kinase 3 $\beta$ ; FZD, Frizzled; LEF, lymphoid enhancer factor; LRP5/6, LDL-receptor related protein 5/6; SFRP, secreted Frizzled related protein; TCF, T-cell factor; P, Phosphorylierung; Pygo, Pygopus; Ub, Ubiquitin; WIF, Wnt inhibitory factor. Abbildung modifiziert nach [75].

Gehalt an  $\beta$ -Catenin in der Zelle gering gehalten und die Translokation in den Zellkern verhindert. Im Zellkern wird die Transkription von LEF/TCF-Zielgenen durch die Interaktion von LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren mit Groucho-Ko-Repressoren verhindert (LEF, lymphoid enhancer-binding factor; TCF, T lymphocyte-specific transcription factor oder T-cell factor) [76,77,78].

In Anwesenheit kanonischer Wnt-Liganden kommt es zur Bildung eines ternären Komplexes aus Wnt, Frizzled und dem Lipoprotein-verwandten Ko-Rezeptor LRP5 oder LRP6 [79,80,81]. Die Interaktion zwischen Wnt-Liganden, Frizzled- und LRP5/6-Rezeptoren kann durch verschiedene Inhibitoren blockiert werden (Abb. 1A). Zu diesen gehören lösliche, Frizzled-verwandte Moleküle (SFRP, secreted Frizzled-related protein) und der Wnt-inhibitorische Faktor-1 (WIF), die im interstitiellen Kompartiment an Wnt-Liganden binden und die Interaktion von Wnt-Liganden mit Frizzled-Rezeptoren kompetitiv hemmen [82,83,84]. Zusätzlich binden sezernierte Dickkopf-Moleküle (DKK) an Kremen und LRP5/6, was die Aktivierung des Wnt-Signalweges durch Internalisierung von LRP verhindert [85,86].

Die Bindung kanonischer Wnt-Liganden an Frizzled- und LRP5/6-Ko-Rezeptoren führt zur Phosphorylierung von LRP5/6 durch CK1 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  [87,88] (Abb. 1B). Danach werden Dishevelled-Moleküle (Dvl) an die Plasmamembran rekrutiert. Dort interagieren diese mit Frizzled und es erfolgt die Polymerisierung mit anderen Dishevelled-Molekülen [89,90]. Nach der Phosphorylierung von LRP5/6 und der Bildung des Dvl-Polymeren transloziert Axin aus dem Multiprotein-Abbaukomplex an die Plasmamembran, wodurch der Komplex zerfällt. Dies führt zur zytoplasmatischen Anreicherung und Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern, wo es einen transkriptionell aktiven Komplex mit LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren bildet [57,91]. Gleichzeitig wird die repressive Bindung von Groucho an LEF/TCF aufgehoben und die Bindung von Ko-Aktivatoren wie BCL9, Pygo und CBP ermöglicht [57,58,59,92,93,94,95,96,97,98].

Bislang wurde eine Vielzahl von Genen identifiziert, deren Transkription durch den  $\beta$ -Catenin/LEF/TCF-Komplex initiiert wird. 1997 wurde *Ubx* (*Ultrabithorax*) als erstes direktes transkriptionelles  $\beta$ -Catenin/LEF-Zielgen in *Drosophila* entdeckt

und später das Proto-Onkogen *c-Myc*, was die transformierende Rolle des kanonischen Wnt-Signalweges in der Kolon-Kanzerogenese bestätigte [99,100]. Inzwischen wurden viele weitere direkte Zielgene identifiziert, die auf der Internetseite <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html> („Wnt Homepage“) stets aktualisiert werden. Die Produkte der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Zielgene übernehmen vielfältige Funktionen; z. B. während der Zelldifferenzierung (Siamois, Brachyury), in der Signaltransduktion (VEGF, FGF, BMP4), in der Zellproliferation (*c-Myc*, Cyclin D1 und D2), in der Zelladhäsion (Twist, Snail, Nr-Cam) und als funktionelle Komponenten des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges, wodurch dessen Aktivität in positiver oder negativer Weise autoreguliert werden kann (Frizzled, DKK, LRP, Axin2,  $\beta$ -TrCP, LEF1, TCF1).

### **Die Bedeutung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges während der Embryonalentwicklung sowie in Regeneration und Tumorentstehung**

Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg übernimmt bei Vertebraten während der Embryonalentwicklung vieler Gewebe und Organe sehr wichtige Funktionen. Dabei kommt es zu Interaktionen mit weiteren bedeutenden Signalwegen, z. B. Tgf $\beta$ /Bmp-, Fgf-, Notch- oder Hedgehog, die sich in Serie oder parallel beeinflussen können. Bereits in einem sehr frühen Stadium der Embryonalentwicklung, vor der Gastrulation, ist die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges für die Induktion des Mesoderms und die korrekte Ausbildung der embryonalen Körperachse von großer Bedeutung. Letzteres wurde zu Beginn des 19. Jahrhunderts von Morgan, Spemann und Mangold nachgewiesen. So konnte mit Lithiumchlorid (einem Aktivator des Wnt-Signalweges), der Transplantation des danach benannten Spemann-Mangold-Organisators oder später durch die Injektion von Wnt1-mRNA eine zweite Körperachse in *Xenopus*-Embryonen induziert werden [101,102,103,104]. Dies zeigte, dass die Ausbildung einer zweiten Körperachse durch die artifizielle Aktivierung der Wnt-Signaltransduktion in Zellen verursacht wird, die während der normalen Embryonalentwicklung wenig Wnt-Aktivität besitzen [103,104,105]. Weitere wichtige Funktionen übernimmt der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in der

Embryonalentwicklung auch bei der Ausprägung des primitiven Endoderms, der Ausbildung der Kopfregion und bei der Entwicklung vieler Organe, was mit verschiedenen Mausmodellen gezeigt wurde [106,107]. Die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges ist zudem notwendig zur Erhaltung der Pluripotenz von ES-Zellen und für den Prozess der Reprogrammierung von ausdifferenzierten Fibroblasten in pluripotente Stammzellen (iPS) [108,109].

In bestimmten Organen, wie der Hypophyse, dem dorsalen Rückenmark oder den Knochen, kontrolliert der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg die Bildung, Aufrechterhaltung oder Spezifizierung von Vorläuferzellen [110,111,112,113]. So induziert  $\beta$ -Catenin/LEF/TCF in der Hypophyse die Expression von *Pitx2*, welches für die Entstehung von *Pit1*-exprimierenden Vorläuferzellen verantwortlich ist. Während der Knochenentwicklung kontrolliert  $\beta$ -Catenin die Differenzierung von osteo-chondrogenen Vorläuferzellen in Osteoblasten [111,112]. Die Bedeutung für die Aufrechterhaltung von Vorläuferzellen lässt sich auch anhand der Entstehung des dorsalen Rückenmarks beobachten. Hier führt die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges zur gesteigerten Proliferation von *Olig3*-exprimierenden Vorläuferzellen und zur Differenzierung überzähliger *Foxd3*- und *Isl1/2*-exprimierender Interneurone (dl2- und 3-Regionen) [113]. Dagegen führt die Nullmutation von  $\beta$ -Catenin zum Fehlen *Olig3*-exprimierender Vorläuferzellen, und der Verlust von *Olig3* verhindert die Bildung von dl2- und dl3-Neuronen [110,114]. Die Kombination aus *Olig3*-Nullmutation und Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin bewirkt den Verlust der dl2- und dl3-Neurone und die Zunahme *Lbx1*-exprimierender Neurone (dl4-dl6), während der proliferative Effekt auf die Vorläuferzellen erhalten bleibt. Dies zeigt, dass Wnt/ $\beta$ -Catenin im dorsalen Rückenmark wichtig ist für die Bildung und Aufrechterhaltung von *Olig3*-exprimierenden Vorläuferzellen, aber nicht für die Differenzierung in dl2- und dl3-Neurone [113].

In sich kontinuierlich erneuernden Geweben und Organen ist der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg für die Selbsterneuerung von multipotenten Gewebe-Stammzellen verantwortlich, z. B. im hämatopoetischen System, in der Haut oder im Darm [107,115,116,117]. So benötigen die intestinalen Stammzellen der Darmkrypten einen aktiven Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg zur Proliferation, um die ständige

Erneuerung des Darmepithels zu gewährleisten [116,118,119]. Während sich die neu gebildeten Darmzellen entlang der Darm-Villi entsprechend ihrer terminalen Funktion ausdifferenzieren, verlieren sie die Fähigkeit zur Zellteilung, und der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg wird abgeschaltet. Bleibt der Signalweg jedoch durch Mutationen in Wnt-Signalweg-Komponenten wie APC oder  $\beta$ -Catenin permanent aktiviert, führt dies zur Entstehung von Darmpolypen, welche für die frühen Stadien der Kolon-Kanzerogenese charakteristisch sind [20,120,121,122]. Andererseits wird bei degenerativen Erkrankungen der Darmmukosa, wie der Crohn-Krankheit, eine nicht ausreichende Aktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges als mögliche Ursache angenommen [118,123,124]. In der Haut kontrolliert die Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalgebung die Differenzierung von Stammzellen zu Haarzellen in den Auswölbungen des Haarfollikels [115]. Der Verlust von  $\beta$ -Catenin führt zum Haarverlust, hat jedoch nur geringen Einfluss auf die Integrität der Epidermis [115]. Zudem wird Wnt/ $\beta$ -Catenin während des Haarzyklus durch den Bmp-Signalweg gehemmt - ein wichtiges Kriterium für die oszillierende Erneuerung und Differenzierung der Haarfollikel-Stammzellen [125,126]. Störungen dieses Systems, die zur permanenten Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges führen, können die Entstehung von Haarfollikel-Tumoren induzieren [127,128]. Es konnte weiter gezeigt werden, dass Krebsstammzellen aus *ras*-induzierten, epidermalen Tumoren aktives  $\beta$ -Catenin zu ihrer Selbsterhaltung benötigen, was die große Bedeutung von Wnt/ $\beta$ -Catenin für die Krebsstammzellen der Haut verdeutlicht [14].

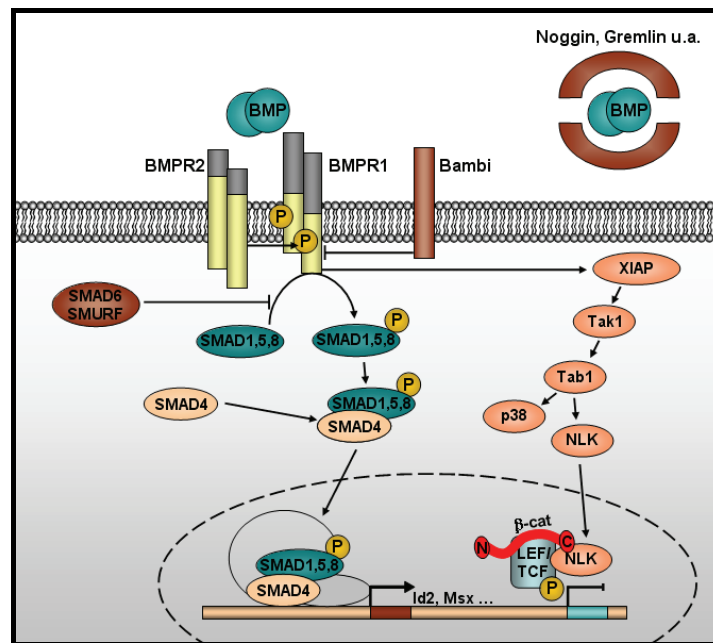
### ***Der Tgf- $\beta$ /Bmp-Signaltransduktionsweg***

Die Tgf- $\beta$ /Bmp-Signalwege (Tgf- $\beta$ : Transforming growth factor- $\beta$ ; Bmp: Bone morphogenetic protein) können durch viele extrazelluläre Liganden aktiviert werden, was eine hohe Diversität in der Signalgebung ermöglicht. So wurden im Säuger genom mindestens 30 Gene identifiziert, die für verschiedene aktivierende Liganden kodieren (Tgf- $\beta$ , Activine, Nodal, Bmp, MIS und GDF) [129]. Die Liganden werden als sogenannte Pre-Proproteine synthetisiert und dimerisieren über ihre Pro-Domänen. Die Dimere werden von Pro-Protein-Konvertasen gespalten und anschließend erfolgt die Sekretion der reifen Liganden-Homodimere [129,130,131]. Durch die spezifische Bindung eines Liganden-Homodimers an zwei Serin-/Threonin-Rezeptorkinasen, Typ I und Typ II, kommt es zur Bildung von hetero-tetrameren Rezeptorkomplexen [132,133]. In Abhängigkeit vom Liganden- und Rezeptor Typ I-Komplex kann intrazellulär zum einen die Smad2/3-Signalkaskade angeschaltet werden, die Tgf- $\beta$ -spezifische Zielgene aktiviert. Zum anderen ist die Initiation der Smad1/5/8-Signalkaskade möglich, wodurch Bmp-spezifische Zielgene induziert werden [133,134,135,136,137,138,139,140].

### **Der Bmp-Signaltransduktionsweg**

Die Aktivierung des Bmp-Signalweges führt zur Phosphorylierung von intrazellulären Smad1/5/8, deren Komplexbildung mit Smad4 und zur Translokation des Komplexes in den Zellkern (Abb. 2). Der für die Bmp-Signaltransduktion charakteristische Phosphorylierungsstatus von Smad1/5/8 wird dabei durch Typ I-Serin-/Threonin-Rezeptorkinasen reguliert. Durch die Bindung von Liganden an Typ I- und Typ II-Rezeptoren werden beide Rezeptoren in räumliche Nähe zueinander gebracht, wodurch der Typ II-Rezeptor den Typ I-Rezeptor phosphorylieren kann [132,133,141,142,143]. In Säugetieren sind vier verschiedene Bmp-Typ I-Rezeptoren, ActRII/Alk1, ActRIa/Alk2, BmpRIa/Alk3 und BmpRIb/Alk6, sowie drei Bmp-Typ II-Rezeptoren, ActRII, BmpRII und MISRII, bekannt [129].





**Abb. 2: Der BMP-Signaltransduktionsweg.** BMP-Liganden binden als Homodimere an Typ I- und Typ II-Rezeptoren (BMPR1 und BMPR2) und initiieren die SMAD1/5/8 bzw. die MAPK-Signalkaskade. Die Liganden-Bindung führt zur Komplexbildung des BMP-Rezeptors-Typ I mit BMP-Rezeptor-Typ II, welcher den BMP-Rezeptor-Typ I C-terminal phosphoryliert und aktiviert. Der aktive BMP-Rezeptor-Typ I phosphoryliert rezeptor-aktivierbares SMAD1/5/8 und vermittelt dessen Bindung an SMAD4 sowie die Translokation in den Zellkern. Im Zellkern bindet der SMAD-Komplex (aus P-SMAD1/5/8 und SMAD4) an SMAD-spezifische Promotorregionen und startet mit Hilfe von Ko-Aktivatoren die Expression BMP-spezifischer Zielgene. BMP-Inhibitoren (Noggin, Gremlin, Bambi, SMAD6, SMURF) hemmen die BMP-SMAD1/5/8 Signalübertragung auf Ebene der Liganden, Rezeptoren oder über SMAD1/5/8. Außer dem BMP-SMAD-Signalweg existiert die BMP-MAPK-Signalübertragung. Der aktivierte BMP-Rezeptor-Typ I interagiert mit XIAP und startet die Tak1-Tab1-NLK/p38-MAPK-Signalkaskade. Der Wnt/β-Catenin-Signalweg wird durch NLK auf Promotorebene inhibiert (LEF/TCF-Phosphorylierung im β-Catenin/LEF/TCF-Komplex). BMP, Bone morphogenetic protein; BMPR, Bmp-Rezeptor; MAPK, Mitogen Aktivierte Proteinkinase; NLK, Nemolike Kinase; β-cat, β-Catenin; P, Phosphorylierung; XIAP, Xenopus Inhibitor of Apoptosis Protein. Abbildung modifiziert nach [129,144].

In Abhängigkeit von der Bindung eines Liganden-Homodimers bildet sich ein Hetero-Tetramer mit verschiedenen Typ I- und Typ II-Rezeptoren. Die Bmp2- oder Bmp4-Liganden-Homodimere binden z. B. an BmpRIa und BmpRII, wobei zwei Serine des BmpRIa phosphoryliert werden. Durch die Phosphorylierung des Typ I-Rezeptors kommt es zur Formation einer Bindungsstelle für rezeptorreguliertes-Smad1/5/8. Die Proteinkinase-Domäne des Typ I-Rezeptors phosphoryliert anschließend gebundenes Smad1/5/8 am C-Terminus [133,145,146]. Danach bildet phosphoryliertes Smad1/5/8 mit Smad4 einen Hetero-Trimerkomplex, der in den Zellkern transloziert [133,145,147,148]. Dort bindet der Komplex an die DNA und induziert die Transkription Bmp-spezifischer

Zielgene in Anwesenheit von Ko-Aktivatoren, wie z. B. OAZ oder CBP/p300 [133,149,150,151,152]. Zu den Zielgenen gehören u. a. verschiedene Transkriptionsfaktoren (*Vent2*, *Msx*, *Gata4*, *Nkx2-5*), Inhibitoren für basische Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren (*Id1*, *Id2*, *Id3*), Zelldifferenzierungs-Gene (*Osteopontin*) oder den Bmp-Signalweg negativ-autoregulierende Gene (*Smad6*, *Smad7*, *Bambi*, *Noggin*) [140].

Neben der Smad1/5/8-typischen Signaltransduktion können Bmp-aktivierte Typ I-Rezeptoren mit XIAP (XIAP, X-linked inhibitor of apoptosis) interagieren. XIAP initiiert die Tak1-MAPK-Signalkaskade, was zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren führt, die an Bmp-aktivierte Smads binden. Dadurch werden einerseits Bmp-spezifische Zielgene aktiviert und andererseits wird so die Aktivität von Smad1 inhibiert [153,154,155,156]. Weiterhin werden durch die Aktivierung von TAK1-NLK auch LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren phosphoryliert. Dadurch wird der Wnt-induzierte und transkriptionell-aktive  $\beta$ -Catenin/LEF/TCF-Komplex gehemmt und eine funktionelle Interaktion der beiden Signalwege geschaffen [157].

Eine inhibitorische Regulation des Bmp-Signalweges kann extrazellulär, membranständig und auch intrazellulär erfolgen (Abb. 2). Extrazelluläre Inhibitoren wie Noggin, Gremlin, Chordin oder Follistatin wirken wechselseitig mit Liganden in der interstitiellen Flüssigkeit und konkurrieren um deren Bindung an Typ I- und Typ II-Rezeptoren [158,159,160,161]. Weiterhin kann der membranständige Pseudorezeptor Bambi mit Typ I-Rezeptoren um die Bindung an Liganden konkurrieren. Im Gegensatz zu Typ I-Rezeptoren fehlt Bambi das Phosphorylierungs-Motiv und die intrazelluläre Kinase-Domäne, wodurch die Aktivierung von Rezeptor-regulierten Smad-Proteinen unmöglich ist [162,163]. Zusätzlich verhindern intrazellulär hemmende Smads (*Smad7*) die Bindung von Smad1/5/8 an Typ I-Rezeptoren, oder es wird die Komplexbildung phosphorylierter Smad1/5/8 mit Smad4 blockiert (durch *Smad6*) [133,164,165]. Schließlich wird eine weitere Negativ-Regulation durch Smurf-Ubiquitin-Ligasen erreicht (Smurf, Smad ubiquitination regulatory factor), indem sie Smads und Rezeptoren binden und deren proteasomalen Abbau einleiten [133,166,167].

## Die Bedeutung des Bmp-Signalweges in der Embryonalentwicklung sowie in Regeneration und Tumorentstehung

Bmp-Liganden wurden erstmals 1965 beschrieben und bekamen ihren Namen aufgrund ihrer Knochen-induzierenden Wirkung [168,169]. In der Tat zeigten Mäuse mit *Bmp5*-Nullmutation Störungen in der Schädelbildung und in axialen Strukturen [170,171,172]. Weiterhin besitzen *Bmp6*- und *BmpRIb*-Null-Mutanten Verknöcherungs- und Gliedmaßenskelettdefekte, und die Aktivierung von *BmpRIa* und *BmpRIb* sowie *Noggin*-Nullmutanten zeigten eine frühzeitige endochondrale Knochenbildung aufgrund verstärkter Chondrogenese [173,174,175,176,177]. Bmp-Liganden sind des Weiteren in vielen Organen exprimiert und übernehmen vielfältige Funktionen in der Embryonalentwicklung [169,178]. So ist die Aktivierung des Bmp-Signalweges bereits in einem sehr frühen embryonalen Stadium für die Mesoderminduktion von großer Bedeutung, weshalb Mäuse mit Null-Mutationen von *BmpRIa*, *BmpRII*, *ActRIa* oder *Bmp4* zum Tod des Embryos während der Gastrulation führen [179,180,181,182,183,184].

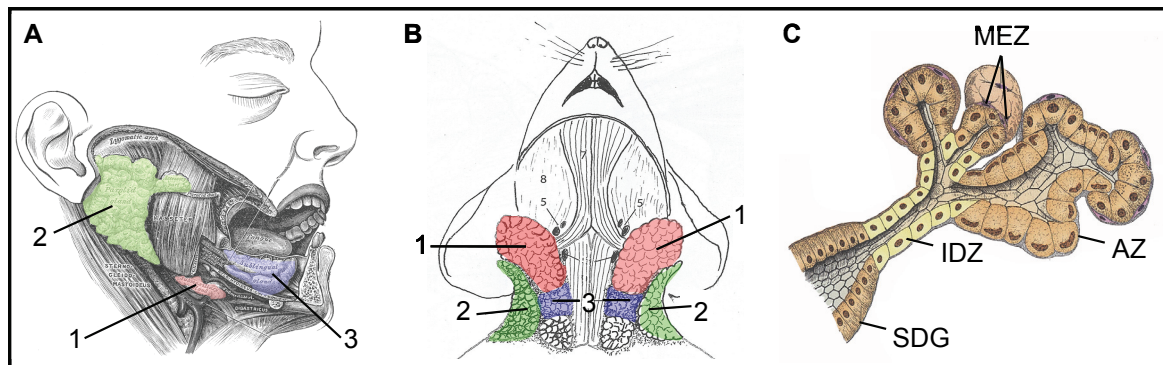
Eine wichtige Rolle übernimmt der Bmp-Signalweg auch bei der Bildung, Selbsterneuerung und Differenzierung spezifischer Vorläufer-Zellpopulationen, z. B. in Keimzellvorläufern, im Pankreas oder im dorsalen Rückenmark. So ist der Bmp-Signalweg essentiell an der Bildung von Keimzellvorläufern beteiligt, was durch den Verlust verschiedener Bmp-Liganden und Smad-Adaptoren bewiesen wurde [182,185,186]. Im Pankreas ist ein aktiver Bmp-Signalweg für die Selbsterneuerung von Pankreas-Vorläuferzellen von Bedeutung. Die Induktion des Bmp-Zielgenes *Id2* in diesen Vorläuferzellen führt zur Hemmung der bHLH-Transkriptionsfaktoren NeuroD und Pax6, was die Differenzierung in endokrine Zellen des Pankreas verhindert [187]. Im dorsalen Rückenmark werden nach der Neuralrohrschließung verstärkt Bmp-Liganden aus der Dachplatte sezerniert, wodurch zunächst die Bmp-Signalgebung und anschließend der kanonische Wnt-Signalweg in bestimmten Vorläuferzellen (p1-3) aktiviert werden. Die Bmp-Signalgebung kontrolliert somit die Differenzierung der an die Dachplatte angrenzenden *Math1*-exprimierenden Vorläuferzellen in bestimmte Neurone (dl1)

[188,189]. Dies zeigte sich durch die konditionellen Nullmutationen von *BmpR1a* und *BmpR1b*, die zum völligen Verlust von dI1-Neuronen führen [190].

In einigen Geweben sind Bmp-Gradienten von Bedeutung, um die Aufrechterhaltung von Stammzellen (geringer Bmp-Gehalt), die Differenzierung und Selbsterneuerung von Vorläuferzellen (hoher Bmp-Gehalt) oder deren Zelltod (sehr hoher Bmp-Gehalt) zu kontrollieren, z. B. in neuralen Stamm- und Vorläuferzellen [191,192,193,194,195,196]. Im Vorderhirn führt die Aktivierung des Bmp-Signalweges zur Differenzierung von Glia-Vorläuferzellen in Astrozyten und ermöglicht deren Selbsterneuerung. Zusätzlich wird die Bildung von Oligodendrozyten verhindert [196,197,198,199]. Ein zu hohes Niveau an Bmp-Signalen im Vorderhirn führt zu verstärkter Apoptose und Holoprosenzephalie, was in *Chordin*<sup>-/-</sup> und *Noggin*<sup>+/-</sup>-Doppelmutanten gezeigt wurde [200]. Im Darmepithel ist ein streng kontrollierter, ansteigender Bmp-Gradient entlang der Krypt-Villus-Achse zu beobachten. So wird die Bmp-Signalgebung in den Stammzellen der Darmkrypten unterdrückt und niedrig gehalten, um die vom Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg angetriebene Zellteilung und Geweberegeneration zu gewährleisten [195]. In den ausdifferenzierten Villuszellen hingegen ist eine zunehmende Aktivität der Bmp-Signaltransduktion zu detektieren. Der Verlust der Bmp-Signalgebung im Darm aufgrund von Mutationen oder der Überaktivierung des Bmp-Inhibitors Noggin führt zur Entstehung von Darmpolypen. Die vererbte Form der Juvenilen Polyposis beim Menschen konnte beispielsweise auf eine Null-Mutation des *BmpR1a* zurückgeführt werden [144,201,202]. In der Haut kontrolliert der Bmp-Signalweg die Aktivität der Haarfollikel-Stammzellen während des Haarzyklus, indem er wiederum den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg zyklisch hemmt [125,126,203]. Der Verlust der Bmp-Signalgebung in der Haut führt zur Entstehung überzähliger Haarfollikel, die sich zu Haarfollikel-Tumoren entwickeln können [128].

### ***Die Bedeutung der Speicheldrüsen und ihre Entwicklung***

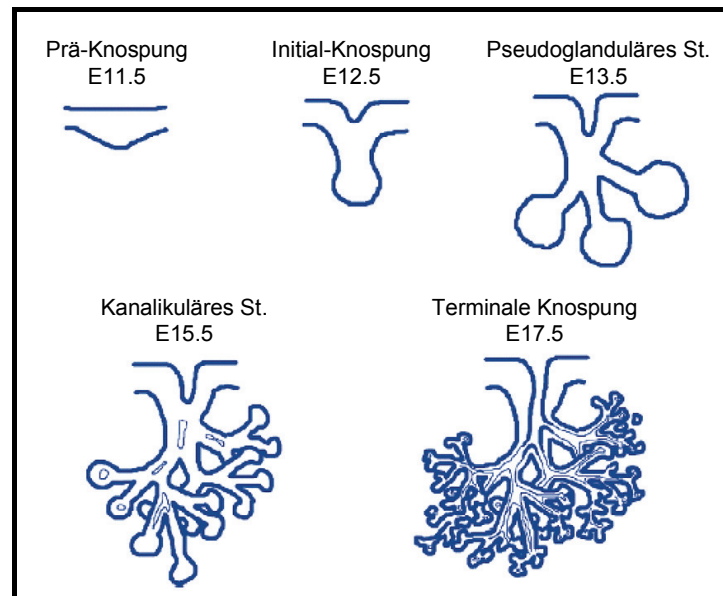
Die Speicheldrüsen übernehmen eine sehr wichtige Rolle in Landlebewesen. Der Speichel ist z. B. von Bedeutung für die Gleitfähigkeit der Nahrung, die Verdauung durch stärke-spaltende Enzyme, zur Geschmacksvermittlung, zur korrekten Laut- und Stimmgebung, bei Vögeln zum Nestbau und bei Reptilien zur Gift-Produktion. Das Vorkommen von Speicheldrüsen ist keineswegs auf Vertebraten beschränkt, und so wurde dieses Organ in *Drosophila* ausgiebig für Studien zur Entwicklung tubulärer Strukturen und zur Organenspezifizierung genutzt [204]. Säugetiere besitzen drei große Speicheldrüsen, die Ohrspeicheldrüse (Glandula parotidea oder Parotis), die Unterkieferspeicheldrüse (Glandula submandibularis oder Submandibularis) und die Unterzungenspeicheldrüse (Glandula sublingualis oder Sublingualis) (Abb. 3A,B). Darüber hinaus gibt es viele kleine Speicheldrüsen in der Wand der Mundhöhle, die nach ihrer Lage bezeichnet werden, wie die Wangendrüsen (Glandulae buccales), Zungendrüsen (Glandulae linguales) oder Geschmacksdrüsen (Glandulae gustatoriae). Die großen Speicheldrüsen, die 90% des Speichels produzieren, unterscheiden sich nicht nur in der Lage, sondern auch in ihrer Histologie und Art des produzierten Speichels. So besitzt die Parotis eine baumartige Struktur mit langen Speicheldrüsen-Gängen und großen mesenchymalen Gewebeanteilen. Dagegen hat die Submandibularis und Sublingualis eine kompakte „weintraubenartige“ Struktur. Generell werden die Speicheldrüsen von Mesenchym umkapselt, das von den Neural-Leisten abstammt [204]. Die Speicheldrüsendgänge enden in den Azini, die ein seröses (wässriges, Amylase-enthaltendes) oder muköses (visköses, Muzin-enthaltendes) Sekret produzieren (Abb. 3C). Zwischen den Speicheldrüsendgängen und Azini befinden sich die Schaltstücke mit den interkalierenden Duktzellen (IDZ), die die Speicheldrüsen-Stammzellen enthalten. Um die Azini befinden sich kontraktile Myoepithelzellen, die den Speichel in die Drüsengänge pressen und wonach das Sekret zum Mundraum abfließt. Die Aktivität der Myoepithelzellen unterliegt dabei der Kontrolle des parasymphatischen und sympathischen Nervensystems [204].



**Abb. 3: Die vergleichende Lage der drei großen Speicheldrüsen bei Mensch und Maus (A,B) sowie schematische Darstellung der Speicheldrüsenendstücke (C).** 1-Unterkieferspeicheldrüse (in rot, Glandula submandibularis), 2-Ohrspeicheldrüse (in grün, Glandula parotidea), 3-Unterzungenspeicheldrüse (in blau, Glandula sublingualis); AZ, Azini; IDZ, Interkalierende Duktzellen; MEZ, Myoepithelzellen; SDG, Speicheldrüsengang (Dukt). Abbildung modifiziert nach [205,206].

Die Submandibularis entwickelt sich zuerst, gefolgt von der Sublingualis und der Parotis. Die Entstehung der Speicheldrüse soll nun kurz am Beispiel der murinen Submandibularis dargestellt werden. Die Entwicklung beginnt am Tag E11.5-12.5 mit einer Verdickung des oralen Epitheliums in der primitiven Mundhöhle (Prä-Knospung, Abb. 4), welche in das benachbarte mandibuläre Mesenchym einwächst und die initiale Einstülpung bildet (Initial-Knospung). Mit zunehmendem Hineinwachsen entwickelt sich die Organanlage zu einem festen epithelialen „Stiel“, der in einem Bulbus endet. Der Stiel bildet den Hauptspeicheldrüsengang. Im pseudoglandulären Stadium (E13.5) wächst die kompakte epitheliale Einstülpung durch sich wiederholende Endverzweigungen weiter in das umgebende Mesenchym ein, wodurch sich die Speicheldrüsenlappen formieren. Zu diesem Zeitpunkt bilden die mesenchymalen Zellen einen lockeren Zellverband, der von extrazellulärer Matrix umgeben ist. Im Kanalikulären Stadium (E15.5) hat sich die Anzahl der Speicheldrüsenlappen bereits wesentlich erhöht und die späteren Speicheldrüsengänge entwickeln typische Lumen, die von kuboidalen epithelialen Zellen ausgekleidet sind. Die Lumen der Drüsengänge entstehen durch Apoptose der zentralen epithelialen Zellen. Zum Zeitpunkt der Terminalen Knospung (E17.5) besitzen die Speicheldrüsengänge und terminalen Endstücke, die späteren Azini, wohlstrukturierte Lumen. Diese sind von einer Einzelzellschicht aus flachen, kuboidalen Epithelzellen umschlossen, die im basalen Bereich an das Mesenchym angrenzen. Perinatal ist die Speicheldrüse von einem Netzwerk großer und kleiner Gänge durchzogen, die in lumen-bildenden Azini enden. Entlang der Gangstrukturen erfolgt postnatal

die Innervation aus dem benachbarten Ganglion. Die endgültige Größe und Funktion erreicht die murine Submandibularis zur Pubertät vier Wochen postpartum [204].



**Abb. 4: Die verschiedenen Stadien der Speicheldrüsen-Entwicklung.** Gezeigt ist die Entwicklung der Submandibulären Speicheldrüse der Maus. Abbildung modifiziert nach [204].

Damit sind für die Entwicklung der Speicheldrüsen verschiedene Prozesse wie Zellproliferation, Differenzierung, Migration, Apoptose und die Interaktion verschiedener Zelltypen wichtig. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die wichtigsten Mausmodelle zur Entwicklung der Speicheldrüse und die beteiligten Signalwege.

**Tab. 2: Phänotypen nach der Mutation von wichtigen Genen der Speicheldrüsenentwicklung.**

Genotyp	Phänotyp
<i>Fgf10</i> <sup>-/-</sup>	Agenesie [207,208,209]
<i>FGFR2b</i> <sup>-/-</sup>	Agenesie [209,210]
<i>FGFR2c</i> <sup>-Δ</sup>	Hypoplasie, an E16 verkleinerte Speicheldrüse [211]
<i>Fgf8</i> (hypomorph)	Hypoplasie, keine Lumenbildung an E18.5 [212]
<i>Fgf8;AP2α</i> <sup>RES<sup>Cre</sup>/+</sup>	Speicheldrüsen-Knospe ohne Verzweigungen [212]
<i>EGFR</i> <sup>-/-</sup>	Weniger Endverzweigungen, vermehrte ECM [213]
<i>TACE</i> <sup>-/-</sup>	Weniger Endverzweigungen, vermehrte ECM [214]
<i>Bmp7</i> <sup>-/-</sup>	Desorganisiertes Mesenchym, weniger Verzweigungen und verringerte Lumen-Bildung [211]
<i>Shh</i> <sup>-/-</sup>	Hypoplasie, keine weitere Entwicklung nach E14 [215]
<i>Lamα5</i> <sup>-/-</sup>	Hypoplasie, desorganisiertes Epithelium [216]
<i>Itga3</i> <sup>-/-</sup>	Desorganisierte Basalmembran, anomale Differenzierung [217]
<i>Itga3</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Itga6</i> <sup>-/-</sup>	Hypoplasie, verzögert einsetzende Verzweigung [216,218]
<i>Mmp14</i> <sup>-/-</sup>	Verzögert einsetzende Verzweigung [219]
<i>Pax6</i> <sup>-/-</sup>	Hypoplasie, desorganisiertes Mesenchym an E17.5 [211]
<i>Twsgl</i> <sup>-/-</sup>	Früher Stopp der Entwicklung [220]
<i>Six1</i> <sup>-/-</sup>	Hypoplasie, normale Histologie [221]
<i>p63</i> <sup>-/-</sup> oder <i>Pitx1</i> <sup>-/-</sup>	Agenesie [222,223]
<i>p120;MMTV-cre</i>	Dysplasie, azinäre Differenzierung gestört [224]
<i>Adam17</i> <sup>-/-</sup>	Anzahl der Verzweigungen verringert, vermehrte ECM [225]
<i>Eda</i> <sup>Ta</sup>	Hypoplasie, Lumenformation gestört, verringerte Anzahl an verzweigten Gängen und Azini [226,227]
<i>EdaR</i> <sup>dl</sup>	Dysplasie, keine Lumen und Azini vorhanden [227]



## ***Speicheldrüsentumoren und Therapieformen***

Speicheldrüsentumoren repräsentieren etwa 8% aller Neoplasien der Kopf-Hals-Region (engl.: „head and neck cancer“), wobei der Häufigkeitsgipfel zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr liegt [228]. Mehr als 95% aller Speicheldrüsentumoren sind epithelialen Ursprungs und sie gehören histologisch zu den heterogenen Tumoren des Menschen [229,230]. Man unterscheidet benigne Pleomorphe Adenome von malignen Formen, wie Adenozystische Karzinome, Muco-Epidermoide Karzinome und Plattenepithel-Karzinome. Zur Untersuchung von Speicheldrüsentumoren wurden bisher verschiedene Mausmodelle entwickelt. So führt die Überexpression von *Fgf8* zu Adenokarzinomen, die Überexpression von *K-Ras* induziert Plattenepithelkarzinome, und die konditionelle Aktivierung von *Plag1* verursacht Pleomorphe Adenome [231,232,233]. Interessanterweise ist der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg an der Entstehung *Plag1*-induzierter Tumoren beteiligt [234]. Aber auch die direkte Aktivierung der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalgebung kann zu Speicheldrüsen-Tumoren führen, welche dabei oft in Verbindung mit Tumoren der Milchdrüsen oder der Prostata auftreten [235,236,237,238].

Zur kurativen Therapie von Speicheldrüsen-Tumoren wird eine Resektion des Primärtumors und aller Lymphknoten-Metastasen im Halsbereich durchgeführt. Wie auch bei anderen Tumoren des Kopf- und Hals-Bereiches führt man postoperativ eine Radiotherapie (Bestrahlung) zur Behandlung von Residualtumoren und Rezidiven durch. Trotz der hohen Überlebensrate wird die Lebensqualität der Patienten durch Strahlentherapie-induzierte Fehlfunktionen der Speicheldrüsen und dem Verlust der intrinsischen Stammzellen beeinträchtigt, was zur Trockenheit der Mundhöhle und weiteren Folgeerkrankungen führt, wie gestörtem Geruchs- und Geschmackssinn, erhöhtem Risiko für orale Infektionen, beeinträchtigter Aussprache und Problemen beim Kauvorgang [239,240]. Diese Symptome bleiben bei mehr als 60% der Patienten bis zum Lebensende bestehen [241]. Um die Situation für den Patienten zu verbessern, werden neben konventionellen Behandlungsmethoden (Stimulation der Speichelproduktion durch Pilocarpin oder Einsatz von Radioprotektoren gegen strahleninduzierte Radikale) auch gewebe-

regenerierende Methoden erforscht [242,243,244]. Die Behandlung mit neuen Stammzellen, die am besten aus der Speicheldrüse selbst stammen sollten, wird dabei als zukünftige Therapie der Wahl angesehen [244]. Die Erkenntnisse über die Biologie der Speicheldrüsen-Stammzellen sind bisher aber nicht ausreichend, um erfolgreich Therapien beim Menschen durchzuführen. So gibt es noch keine hinreichenden Ergebnisse zu geeigneten Isolations- und Kultivierungstechniken sowie über die Aktivität von Signalwegen in Speicheldrüsen-Stammzellen.

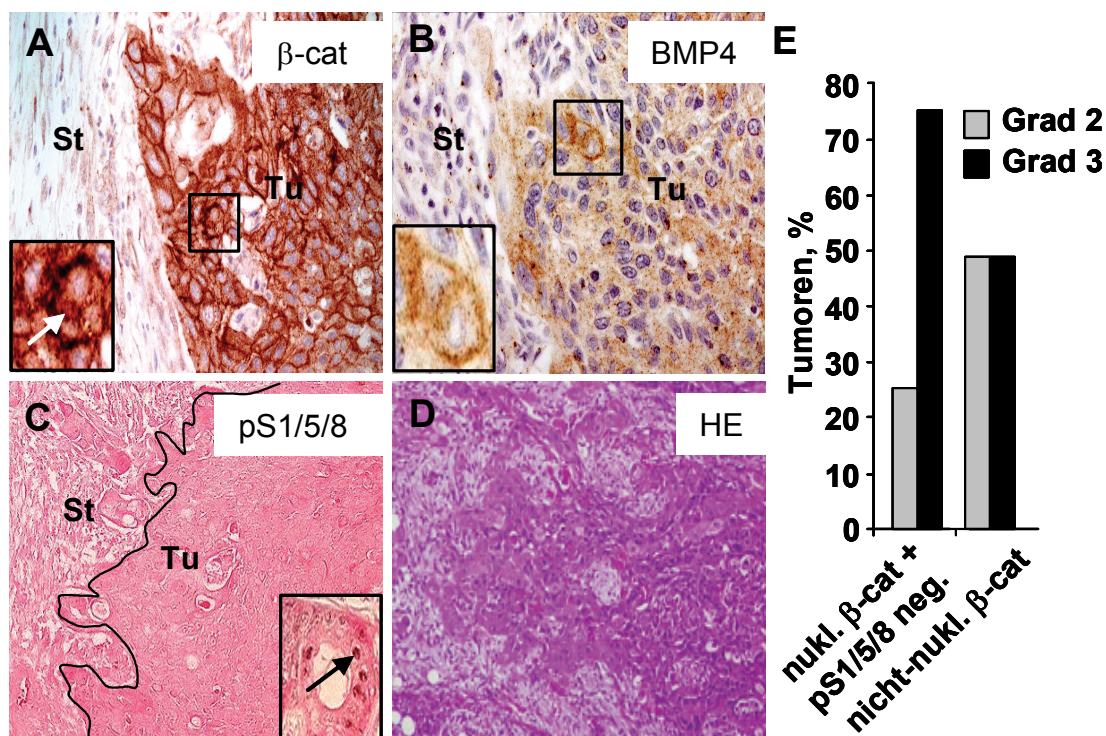
### ***Zielstellung dieser Arbeit***

Die große Bedeutung der Wnt/ $\beta$ -Catenin- und Bmp-Signalgebung für die Kontrolle adulter Stammzellen wurde bereits in einigen Organen gezeigt, z. B. in der Haut, im Darm oder im hämatopoetischen System. Dort kontrollieren beide Signalwege wichtige Prozesse, wie Organentwicklung, Gewebe-Homöostase und Regeneration. Andererseits werden durch funktionelle Störungen dieser Signalwege degenerative Erkrankungen oder Tumoren induziert. Zu Beginn der Arbeit wurde festgestellt, dass die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin- und die gleichzeitige Inhibierung des Bmp-Signalweges zu aggressiven Speicheldrüsen-Tumoren bei Mensch und Maus führten. Das Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die noch unbekannte Rolle beider Signalwege in der Tumorentstehung, Organentwicklung und Regeneration in der Speicheldrüse zu untersuchen. Es sollte aufgeklärt werden, welche funktionellen Gemeinsamkeiten und Unterschiede diese Prozesse in den Gewebestammzellen steuern. Konventionelle Mutationen der Wnt/ $\beta$ -Catenin- und Bmp-Signalgebungen führen in der Maus zum embryonalen Tod, was genetische Analysen im adulten Tier verhindert. Deshalb musste der Einfluss beider Signalwege auf die adulten Stammzellen der Speicheldrüse mittels konditionell vermittelter Mutagenese untersucht werden. Bei der Untersuchung der normalen Stammzellen und deren Abkömmlingen in der Speicheldrüse der Maus haben wir gefunden, dass epigenetische Mechanismen den Übergang von normalen Stammzellen zu Krebsstammzellen steuern. Diese Ergebnisse haben neue Ansatzpunkte für die Behandlung von Krebsstammzellen aufgezeigt und therapieorientierte Einblicke in das regenerative Potential der Speicheldrüsen vermittelt.

## Ergebnisse

### ***Humane Speicheldrüsen-Karzinome zeigen Deregulierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin- und Bmp-Signalweges***

Veränderungen in den Wnt/ $\beta$ -Catenin- und Bmp-Signalwegen haben eine große Bedeutung für die Tumorentstehung in verschiedenen Organen, z. B. in Darm- und Haut-Tumoren [107,245]. Zu Beginn dieser Arbeit wurden verschiedene Tumortypen auf die Aktivitäten dieser beiden Signalwege untersucht, um deren Interaktion in der Tumorprogression zu verstehen. So wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Christoph Loddenkemper, einem erfahrenen Pathologen der Charité Universitätsmedizin Berlin, humane Plattenepithel-Karzinome der Speicheldrüse untersucht. Plattenepithel-Karzinome der Speicheldrüsen beim Menschen (engl. „squamous cell carcinoma“) sind selten, aber sehr aggressiv [246]. Wir haben nukleäres  $\beta$ -Catenin (einen Marker für aktive Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalgebung [107]) und phosphoryliertes Smad1/5/8 gemessen (einen Marker für Bmp-Signalaktivität [247]). Interessanterweise konnte nukleäres  $\beta$ -Catenin an den invasiven Fronten der Speicheldrüsen-Karzinome lokalisiert werden (Abb. 5A). Das Wnt/ $\beta$ -Catenin-Zielgen BMP4 war ebenso verstärkt an den Tumorfronten nachzuweisen (Abb. 5B) [248]. Im Gegensatz dazu war pSmad1/5/8 in den differenzierten Bereichen der Tumoren erhöht, jedoch nicht an den Tumorfronten (Abb. 5C). Die Kombination von nukleärem  $\beta$ -Catenin und dem Verlust von pSmad1/5/8 konnte in 75% der aggressiven Tumoren (Grad 3) nachgewiesen werden (Abb. 5E). Dagegen verteilten sich Tumoren ohne nukleäres  $\beta$ -Catenin gleichmäßig auf Karzinome mit Grad 2 oder Grad 3. Diese Ergebnisse zeigten, dass die aggressivsten humanen Plattenepithel-Karzinome durch eine verstärkte Wnt/ $\beta$ -Catenin- und niedrige Bmp-Signalgebung charakterisiert waren.



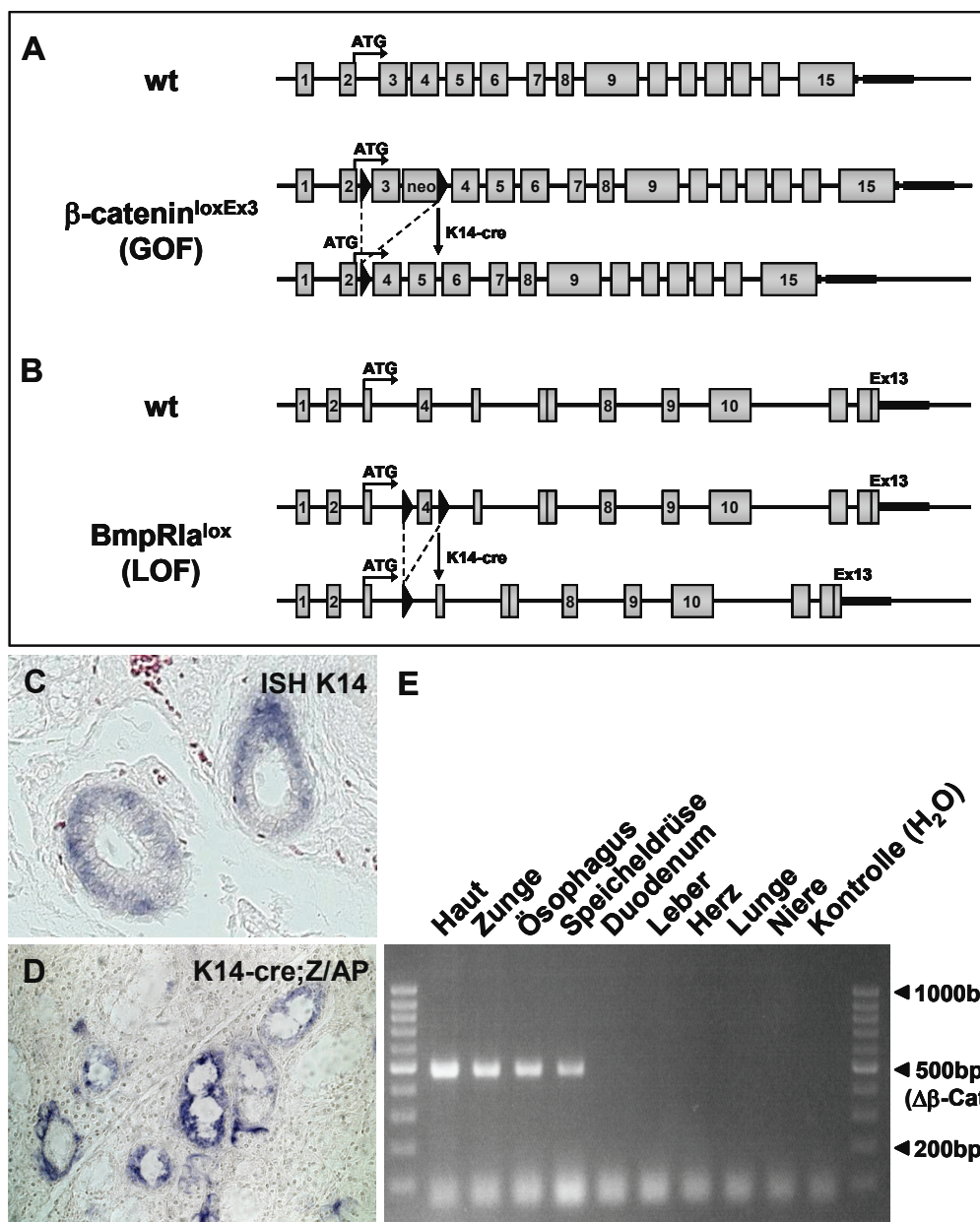
**Abb. 5: Eine überaktivierte Wnt/β-Catenin Signalgebung und der gleichzeitige Verlust der BMP-Signaltransduktion sind charakteristisch für Plattenepithel-Karzinome in humanen Speicheldrüsen. (A-D)** Paraffinschnitte von humanen Plattenepithel-Karzinomen, analysiert mit Immunhistochemie für β-Catenin (A), BMP4 (B) und phosphoryliertes Smad 1/5/8 (C). Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist in (D) gezeigt. An den Tumorfronten ist β-Catenin im Nukleus, aber auch an den Zellverbindungen lokalisiert (s. Vergrößerung). Das Wnt/β-Catenin-Zielgen BMP4 ist zytoplasmatisch lokalisiert und wird verstärkt an den Tumorfronten exprimiert (s. Vergrößerung). Das nukleäre pSmad1/5/8-Signal ist negativ an den Tumorfronten, aber erhöht in tubulären Zellen in differenzierten Arealen des gleichen Tumors (s. Vergrößerung); St, Stroma; Tu, Tumor. (E) Quantifizierung der Ergebnisse von Abb. 5A,C: Die spezifische Kombination aus nukleärem β-Catenin und dem Verlust von pSmad1/5/8 wurde in 75% der aggressiven, Grad 3-Tumoren nachgewiesen. Tumoren ohne nukleäres β-Catenin verteilten sich gleichmäßig auf Grad 2- und Grad 3-Karzinome.

### ***Herstellung eines Mausmodells für Plattenepithel-Karzinome der Speicheldrüse***

Um zu untersuchen, ob aggressive Plattenepithel-Karzinome der Speicheldrüsen ursächlich durch die Aktivierung der Wnt/β-Catenin-Signalgebung und den Verlust der Bmp-Signalaktivität gekennzeichnet sind, und um Material für intensivere Untersuchungen zu erhalten, wurde ein entsprechendes Mausmodell etabliert. Dafür wurden mittels Cre/LoxP-Technik aktivierende β-Catenin- und inaktivierende Mutationen des Bmp-Rezeptors Ia in Epithelien der Haut und Organen des oberen Gastrointestinaltraktes eingeführt, wozu auch die

Speicheldrüse gehört (Abb. 6). Die Gruppe von Taketo, Universität Kyoto, Japan, hatte LoxP-Sequenzen (schwarze Dreiecke) in Introne vor und nach Exon 3 des  $\beta$ -Catenin-Gens eingeführt (Abb. 6A;  $\beta$ -Catenin<sup>loxEx3</sup>) [122]. Exon 3 kodiert für N-terminale Aminosäuren im  $\beta$ -Catenin-Protein, die als Erkennungssequenzen für dessen Phosphorylierung und anschließenden Abbau essentiell sind [68,69,70]. Die Induktion der Cre-Rekombinase erzeugte ein  $\beta$ -Catenin-GOF-Allel (engl. „gain-of-function mutation“, „GOF“), welches zur Expression von konstitutiv aktivem  $\beta$ -Catenin führt, dem nach Deletion des Exons 3 das N-terminale Phosphorylierungsmotiv fehlt (daher auch „ $\Delta$ N- $\beta$ -Cat“ genannt). Zur Inaktivierung des Bmp-Signalweges hat die Gruppe von Behringer, Universität von Texas, USA, LoxP-Sequenzen in die intronischen Sequenzen vor und nach Exon 4 des BmpRla-Gens (BmpRla<sup>lox</sup> oder  $\Delta$ BmpRla) eingeführt (Abb. 6B) [249]. Nach Induktion der Cre-Rekombination wird nach den ersten 67 Nukleotiden eine Leseraster-Verschiebung erzeugt, die ein Stopp-Kodon entstehen lässt. Dies führt zum Verlust der Expression und der Funktion des BmpRla (engl. „loss-of-function mutation“, „LOF“).

Konditionelle Mutationen wurden mittels transgener Mäuse induziert, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Keratin 14-Promotors exprimieren [115]. Keratin 14 (K14) wird in verschiedenen, komplex aufgebauten Epithelien des Körpers exprimiert (z. B. in der Haut, im Ösophagus und in der Speicheldrüse) und gehört zur Gruppe der sauren Typ I-Intermediärfilamente. Im Speicheldrüsenepithel wird K14 hauptsächlich in luminalen Basalzellen der Speicheldrüsengänge exprimiert, wie anhand der blauen Färbung durch *In-situ*-Hybridisierung nachgewiesen wurde (Abb. 6C) [250]. Zur Überprüfung der Aktivität der Cre-Rekombinase wurde die Z/AP-Indikator-Mauslinie verwendet. Diese Mauslinie exprimiert Alkalische Phosphatase in allen Zellen, in denen die Cre-Rekombinase aktiv ist [251]. Die Expression Alkalischer Phosphatase konnte in den Epithelzellen der Speicheldrüsengänge durch die blaue Färbung nachgewiesen werden (Abb. 6D). Spezifische PCR zeigte, dass in K14-exprimierenden Organen wie Haut, Zunge, Ösophagus und Speicheldrüse rekombiniertes  $\beta$ -Catenin entstanden war (Abb. 6E). Die K14-Cre-Mauslinie eignet sich demnach, um die Bedeutung der  $\beta$ -Catenin- und BmpRla-Signalwege in der Speicheldrüse und anderen verwandten Epithelien zu studieren.

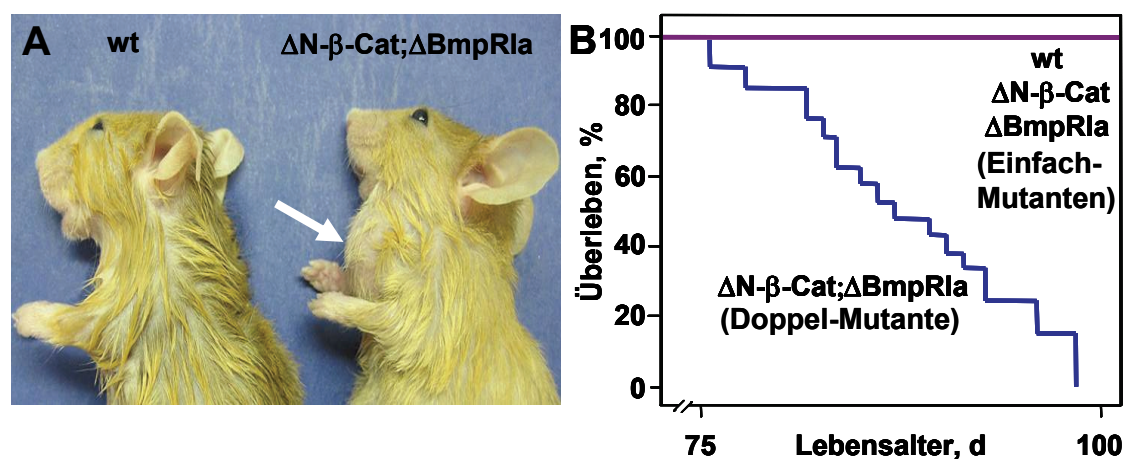


**Abb. 6: Generierung K14-Cre-vermittelter Mutationen im  $\beta$ -Catenin- oder BmpR1a-Gen.** (A,B) Schematische Darstellung der  $\beta$ -Catenin- (A) und BmpR1a-Rekombinationsvektoren (B) sowie der genomisch wildtypischen (wt) und mutierten Allele. Im  $\beta$ -Catenin-Rekombinationsvektor waren LoxP-Sequenzen (schwarze Dreiecke) in Introne eingeführt, welche Exon 3 ( $\beta$ -Catenin<sup>loxEx3</sup>) [122] flankieren. Im BmpR1a<sup>lox</sup>-Rekombinationsvektor waren LoxP-Sequenzen in die Introne eingeführt, welche Exon 4 flankieren [249]. Durch K14-Cre-vermittelte Rekombination werden die Exone zwischen den LoxP-Sequenzen herausgeschnitten, so dass Mutationen in den  $\beta$ -Catenin- und BmpR1a-Genen entstehen, die zu konstitutiv aktiven  $\beta$ -Catenin ( $\beta$ -Catenin<sup>loxEx3</sup>) oder dem Expressionsverlust von BmpR1a<sup>lox</sup> führen. GOF, Gain-of-Function-Mutation; LOF, Loss-of-Function-Mutation. Rechtecke markieren die Exone. (C) Nachweis der Keratin 14-Expression in luminalen Epithelzellen der Speicheldrüsengänge in der Maus mittels *In-situ*-Hybridisierung. (D) Die K14-Cre-vermittelte Expression alkalischer Phosphatase zeigt die zellspezifische Expression der Cre-Rekombinase in den Epithelzellen der Speicheldrüsengänge. (E) Die K14-Cre-vermittelte Rekombination des  $\beta$ -Catenin-Gens ( $\Delta\beta$ -Cat) wurde durch PCR in Haut, Zunge, Ösophagus und in der Speicheldrüse nachgewiesen.



### ***Tumorentstehung in Speicheldrüsen von Mäusen mit verstärktem Wnt/ $\beta$ -Catenin- und gehemmten BmpR1a-Signalweg***

In der Tat entwickelten sich aggressive Speicheldrüsen-Tumoren in den doppelt-mutanten Mäusen ( $\Delta N\text{-}\beta\text{-Cat-GOF}$ ;  $\Delta BmpR1a\text{-LOF}$ ). Kaplan-Meier-Überlebenskurven zeigten, dass die doppelt-mutanten Mäuse zwischen Tag P75 und P90 aufgrund der Tumorentwicklung starben (Abb. 7A,B). Einfach-mutante  $\Delta BmpR1a$ -Mäuse lebten dagegen genauso lange wie wildtypische Mäuse, wohingegen  $\Delta N\text{-}\beta\text{-Catenin}$ -Mäuse etwa ab Tag P150 starben und teilweise pathologische Veränderungen des Ösophagus, des Magens und der Haut entwickelten (Daten nicht gezeigt). In den beiden einfach-mutanten Mausmodellen ( $\Delta N\text{-}\beta\text{-Cat}$  und  $\Delta BmpR1a$ ) wurden keine Tumoren in den Speicheldrüsen oder anderen Organen entdeckt.



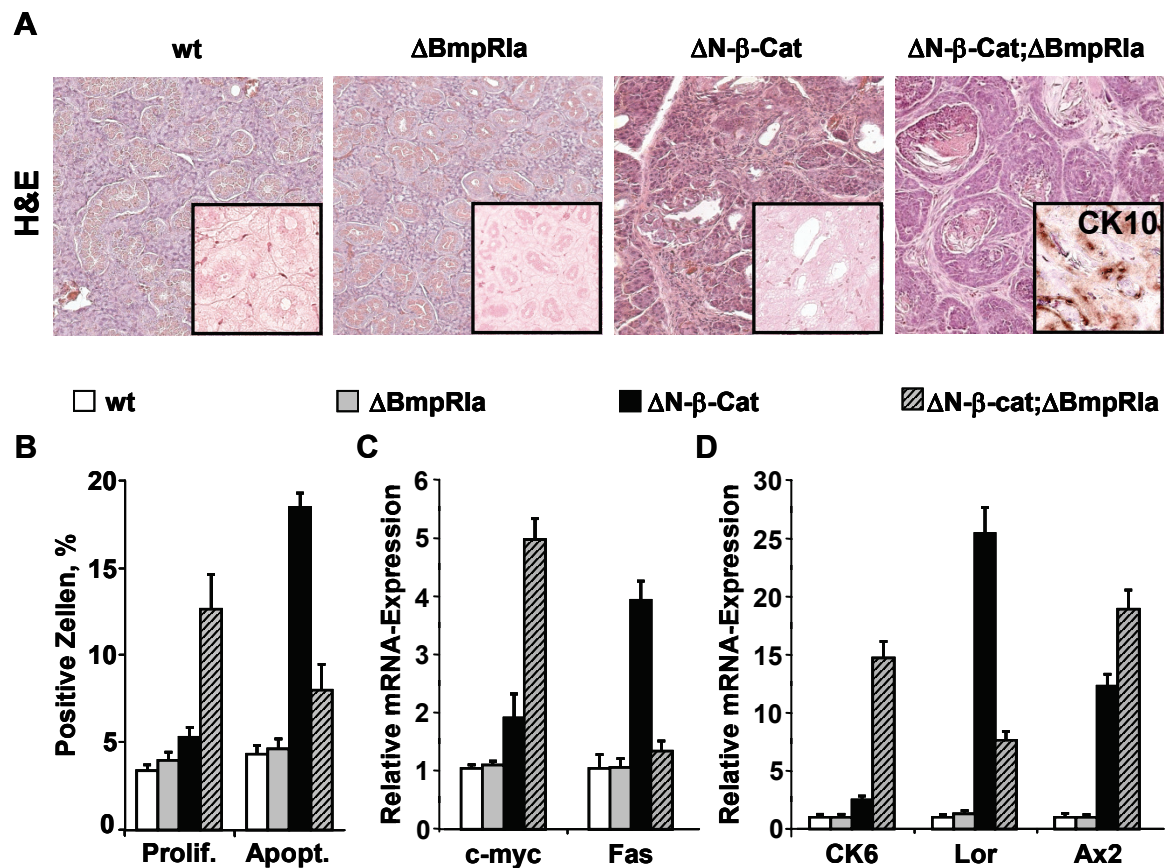
**Abb. 7: Tumorentstehung in den Speicheldrüsen von doppelt-mutanten Mäusen mit verstärkter Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalgebung und BmpR1a-Funktionsverlust. (A) Makroskopische Ansicht eines Speicheldrüsentumors zum Zeitpunkt P90. Dargestellt sind wildtypische (wt) und doppelt-mutante Mäuse ( $\Delta N\text{-}\beta\text{-Cat};\Delta BmpR1a$ ). Der Tumor ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. (B) Kaplan-Meier-Überlebenskurven von doppelt-mutanten Mäusen ( $\Delta N\text{-}\beta\text{-Cat};\Delta BmpR1a$ ) im Vergleich zu wildtypischen und einfach-mutanten Tieren ( $\Delta N\text{-}\beta\text{-Cat}$  oder  $\Delta BmpR1a$ ; n=21 für alle Genotypen).**

Prof. Christoph Loddenkemper, ein Pathologe der Charité Universitätsmedizin Berlin, hat die Tumoren unserer Mäuse als Plattenepithel-Karzinome klassifiziert (Abb. 8A). Dies konnte zusätzlich anhand der Expression des spezifischen Markers Cytokeratin 10 (CK10) verifiziert werden (Einschübe in Abb. 8A) [250]. In den Speicheldrüsen von einfach-mutanten  $\Delta N\text{-}\beta\text{-Catenin}$ -Mäusen konnten teilweise histologische Veränderungen, wie hyperproliferatives Epithel oder die

Bildung von Zysten, nachgewiesen werden, jedoch keine Expression von CK10. Die Histologie der Speicheldrüsen von einfach-mutanten  $\Delta$ BmpR1a-Mäusen entsprach der von wildtypischen Mäusen.

Im Folgenden wurden Analysen zu histologischen Parametern und zur Regulation wichtiger Gene für Proliferation, Apoptose und Differenzierung in den mutanten Speicheldrüsen durchgeführt. Zellproliferations- und Apoptose-Indizes wurden durch immunhistochemischen Nachweis von Phospho-Histon 3 und aktivierter Caspase 3 ermittelt [252,253]. In den Tumoren der Speicheldrüse war der Proliferations-Index dreifach erhöht, im Vergleich zu Wildtyp- und einfach-mutanten  $\Delta$ BmpR1a-Mäusen. Die Proliferation in den Speicheldrüsen der einfach-mutanten  $\Delta$ N- $\beta$ -Catenin-Mäuse war leicht erhöht (Abb. 8B). Im Gegensatz dazu konnte ein starker Anstieg des Apoptose-Index in den einfach-mutanten  $\Delta$ N- $\beta$ -Catenin-Mäusen festgestellt werden (Abb. 8B). Die Expressionen der Proliferations-Marker c-myc und CK6 erreichten ihre höchsten Niveaus in den Speicheldrüsen der doppelt-mutanten Mäuse (Abb. 8C,D) [100,254]. Dagegen konnte die höchste Expression des Apoptose-Markers Fas und des Differenzierungs-Gens Loricrin in Speicheldrüsen von einfach-mutanten  $\Delta$ N- $\beta$ -Catenin-Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 8C,D) [255,256]. Diese Daten zeigen, dass eine aktivierte Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalgebung sowohl Proliferation als auch Apoptose induzieren kann, wobei letztere durch eine aktive Bmp-Signalgebung vermittelt wird. Durch das Zusammentreffen beider Ereignisse entwickeln die doppelt-mutanten Mäuse Tumoren der Speicheldrüse.









**Abb. 8: Charakterisierung von Speicheldrüsen-Tumoren aus doppelt-mutanten Mäusen ( $\Delta N-\beta-Cat;\Delta BmpR1a$ ) und Regulation von Proliferation, Apoptose und Differenzierung in den Speicheldrüsen am Tag P90. (A) Histologie der Speicheldrüsen von wildtypischen, einfach-mutanten ( $\Delta N-\beta-Cat$  oder  $\Delta BmpR1a$ ) und tumorigenen, doppelt-mutanten ( $\Delta N-\beta-Cat;\Delta BmpR1a$ ) Mäusen, untersucht mit Hämatoxylin-Eosin-Färbungen und Immunhistochemie für CK10 (Marker für Plattenepithel-Karzinome [250]; s. Einfügungen). (B) Quantifizierung von Proliferation und Apoptose in den Speicheldrüsen von wildtypischen und mutanten Mäusen, analysiert mit Immunfluoreszenz für Phospho-Histon 3 und aktivierter Caspase 3. (C,D) Quantitative Echtzeit-PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression von charakteristischen Genen für Proliferation (c-myc, CK6), Apoptose (Fas), Differenzierung (Loricrin) und für den Aktivierungsstatus des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges (Axin2). Das Diagramm zeigt die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3).**

## **Genexpressionsanalyse von einfach- und doppelt-mutanten Speicheldrüsen**

In diesem Experiment wurde untersucht, ob die Veränderungen in Proliferation und Apoptose sowie die unterschiedliche Expression diverser Zielgene in den Speicheldrüsen detektiert werden können. Dafür wurden Affymetrix-Microarray-Analysen von Speicheldrüsen der vier Genotypen am Tag P1 durchgeführt. Es zeigte sich, dass spezifische Gene, die wichtig sind für Proliferation und

transkriptionelle Regulation, in den doppelt-mutanten Speicheldrüsen heraufreguliert waren (Abb. 9). Im Gegensatz dazu waren Gene, die in Apoptose und Differenzierung involviert sind, hoch exprimiert in einfach-mutanten  $\Delta N$ - $\beta$ -Catenin-Mäusen, aber stark herunterreguliert in doppelt-mutanten  $\Delta N$ - $\beta$ -Cat; $\Delta$ BmpRla-Tieren. Die Expressionsprofile von wildtypischen und einfach-mutanten  $\Delta$ BmpRla-Mäusen zeigten diesbezüglich keine Unterschiede. Diese Ergebnisse veranschaulichen, dass die Deregulierung zellulärer Programme wie Proliferation, Apoptose und Differenzierung bereits frühzeitig in den doppelt-mutanten Mäusen nachgewiesen werden kann.

Funktionelle Einteilung der differentiell exprimierten Gene	Differenzielle Genexpressionen			
	$\Delta$ Bmpr1a / wt	$\Delta$ N- $\beta$ cat / wt	dm / $\Delta$ N- $\beta$ cat	
<b>Signaltransduktion</b>				<b>Wnt/<math>\beta</math>-Catenin-Signalgebung</b> 
Dickkopf homolog 4 (Xenopus laevis)	n.c.	2.0	16.8	
Mitogen activated protein kinase 8	14.1	0.5	6.1	
Bone morphogenetic protein 2	n.c.	3.6	4.5	
Bone morphogenetic protein 4	0.7	3.1	4.0	
Fibroblast growth factor 4	n.c.	n.c.	3.7	
Lymphoid enhancer binding factor 1 (Lef1)	n.c.	1.6	3.6	
<b>Differenzierung</b>				<b>Differenzierung</b> 
Loricrin	n.c.	70.9	0.3	
Repetin	n.c.	52.6	0.02	
Keratin 36	n.c.	16.2	0.1	
Small proline-rich protein 1A	n.c.	8.4	n.c.	
Suprabasin	2.0	7.5	0.3	
<b>Proliferation, Transkription und Translation</b>				<b>Proliferation</b> 
TSC22-related inducible leucine zipper 1b (Tilz1b)	n.c.	n.c.	35.2	
Eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3	0.2	0.2	19.7	
AF4/FMR2 family, member 3 (Aff3), mRNA	2.8	n.c.	12.6	
Jumonji, AT rich interactive domain 1D (Rbp2 like)	0.5	0.2	7.4	
Prospero-related homeobox 1	n.c.	n.c.	6.0	
High mobility group box transcription factor 1	1.7	0.3	5.3	
Forkhead box A2	n.c.	n.c.	4.5	
GATA binding protein 2	0.7	n.c.	4.0	
<b>Apoptose</b>				<b>Apoptose</b> 
Clusterin	1.6	6.6	0.6	
Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	0.6	2.8	n.c.	
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b	n.c.	2.6	0.4	
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a	2.0	2.4	n.c.	
Death associated protein kinase 1 (Dapk1), mRNA	n.c.	2.2	0.1	
Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	n.c.	1.9	0.6	

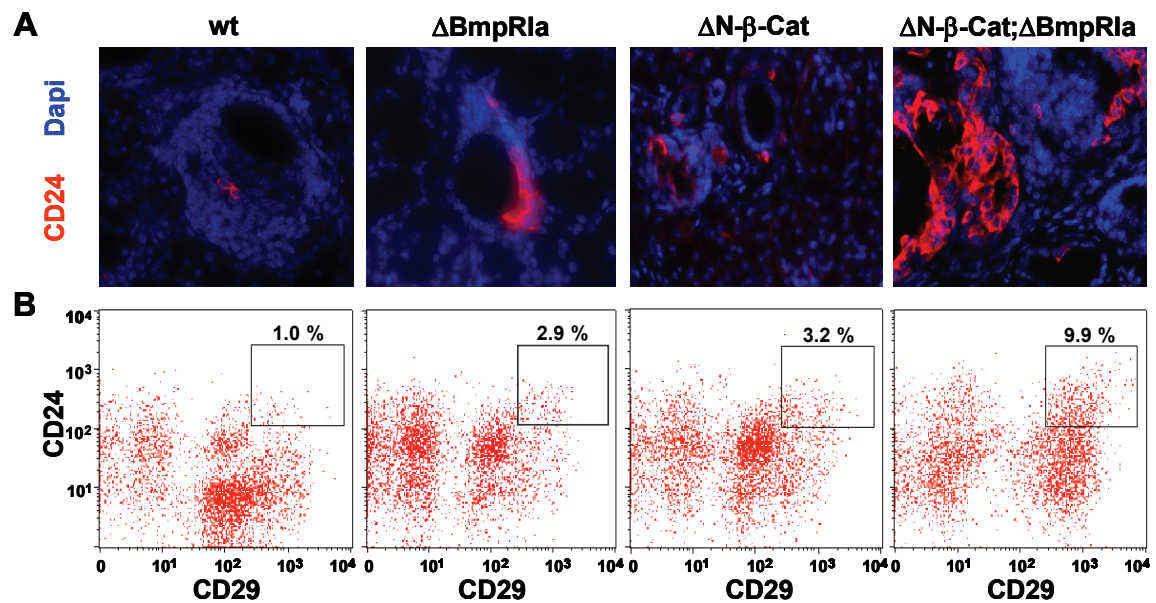
**Abb. 9: Genexpressions-Analysen von wildtypischen und mutanten Speicheldrüsen an P1.** Die differentiell exprimierten Gene wurden in vier Gruppen eingeteilt, welche Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalgebung, Differenzierung, Proliferation und Apoptose repräsentieren (verschiedenfarbig unterlegt). Die rote Einrahmung hebt die Ergebnisse der differentiellen Genexpression in den Speicheldrüsen von doppelt-mutanten  $\Delta N$ - $\beta$ -Cat; $\Delta$ BmpRla- im Vergleich zu einfach-mutanten  $\Delta N$ - $\beta$ -Catenin-Mäusen hervor. Die roten Pfeile rechts fassen das Expressionsverhalten in den doppelt-mutanten, tumorigenen Speicheldrüsen zusammen. Angegeben sind die Quotienten aus den jeweiligen Expressionsdaten der verschiedenen Genotypen (wt, Wildtyp; dm, doppelt-mutant; jeder Genotyp n=3; n.c., unverändert).

### ***Identifizierung von Krebsstammzellen in Plattenepithel-Karzinomen der Speicheldrüsen***

Um die auffälligen Unterschiede in der Morphologie und den transkriptionellen Profilen der Speicheldrüsen zu untersuchen, haben wir die Gewebe-Stammzellen in den wildtypischen und mutanten Speicheldrüsen bestimmt. Es wurden die Zelloberflächenmarker CD29 und CD24 eingesetzt; CD29 ( $\beta 1$ -Integrin) wurde bereits als ein Marker für Speicheldrüsen-Stammzellen verwendet[257], und CD24 ist als Stammzellmarker in anderen Geweben beschrieben [258,259,260]. Der Anteil der CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Stammzellen betrug im Wildtyp 1%, erhöhte sich auf ca. 3% in den einfach-mutanten Speicheldrüsen und stieg auf 9,9% in doppelt-mutanten Tieren an (Abb. 10B). Die Stammzellen traten in Clustern auf; dies war besonders in den doppelt-mutanten Speicheldrüsen zu sehen (Abb. 10A).

Im Folgenden wurde untersucht, ob die CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Zellpopulation aus den Tumoren der doppelt-mutanten Mäuse tumor-initiierende bzw. Krebsstammzell-Eigenschaften besitzen. Zu diesem Zweck wurden unsortierte Tumorzellen und per FACS angereicherte CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Tumorzellen (Abb. 10B, rechts) in abnehmenden Zellzahlen subkutan in die Rückenhaut von NOD/SCID-Mäusen injiziert (Tab. 3). Unsortierte Tumorzellen waren nach der Transplantation von 100.000 Zellen nur moderat tumorigen und entwickelten große Tumoren erst nach der Injektion von 1 Million Zellen. Im Gegensatz dazu waren die CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Tumorzellen hoch tumorigen und produzierten schnell wachsende Tumoren, wenn lediglich 500 Zellen injiziert wurden. Dieser Transplantations-Versuch zeigte somit deutlich, dass die CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Tumorzellen der doppelt-mutanten Mäuse Eigenschaften von tumor-initiierenden bzw. Krebsstammzellen besitzen [19].

Als weiteres Kriterium von Krebsstammzellen wurde das Potential untersucht, den Primärtumor nach Transplantation histologisch zu reproduzieren. Tatsächlich zeigte die Histologie der transplantierten Tumoren Speicheldrüsendgang-artige und CK10-positive Bereiche. Trotzdem waren die transplantierten Tumoren oft undifferenziert und konnten den Primärtumor nicht vollständig reproduzieren (Abb. 11).



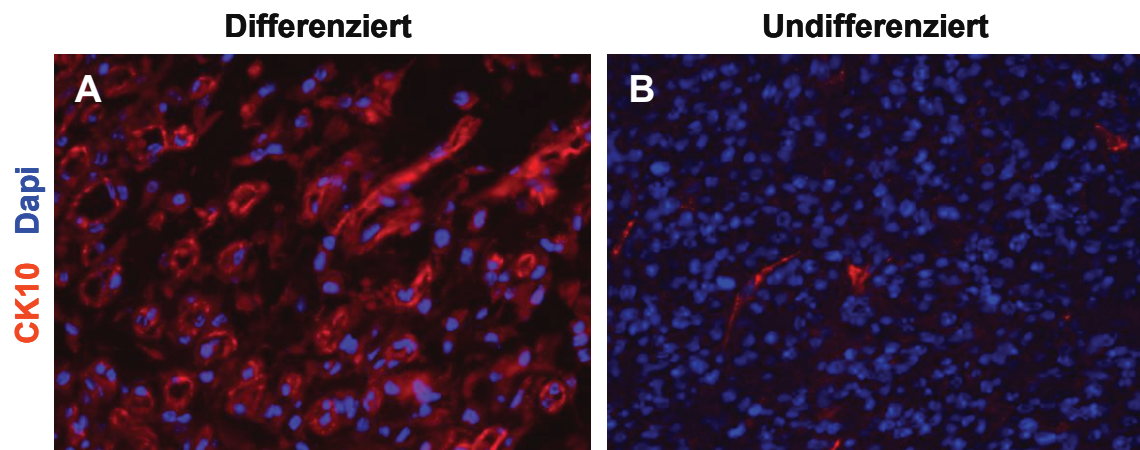
**Abb. 10: Zunahme der CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Stammzell-Population in Speicheldrüsen von einfachen zu doppelt-mutanten Mäusen. (A)** Immunfluoreszenz-Färbung für den Stammzellmarker CD24 (in rot, nukleäres Dapi in blau) auf Schnitten der Speicheldrüsen von wildtypischen (wt) sowie einfach- (ΔBmpR1a oder ΔN-β-Cat) und doppelt-mutanten Mäusen (ΔN-β-Cat;ΔBmpR1a). **(B)** FACS-Analyse von wildtypischen und mutanten Speicheldrüsen-Zellen für die Stammzellmarker CD24 und CD29. Zellen mit hoher CD24- und CD29-Expression sind durch ein Rechteck markiert. Der Anteil der CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Zellen an der gesamten Zellpopulation ist für jeden Genotyp über dem Rechteck angegeben (Mittelwert aus n=3).

**Tab. 3: Transplantation von Tumorzellen aus doppelt-mutanten Speicheldrüsen zum Nachweis von Krebsstammzell-Eigenschaften**

Anzahl transplantierte Zellen <sup>a)</sup>	unsortiert <sup>b)</sup>	CD24 <sup>+</sup> CD29 <sup>+</sup> <sup>b)</sup>
10 Millionen	+	+
1 Million	+	+
100.000	+/-	+
10.000	-	+
1000	-	+
500	-	+/-
100	-	-

a) Unsortierte und CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Zellen (s. Abb. 10B, rechts) wurden in die Rückenhaut von NOD/SCID-Mäusen transplantiert und das Tumorstadium nach drei Wochen registriert.

b) + bedeutet, dass alle Injektionen Tumoren verursachten; +/-, zwei von drei Injektionen verursachten Tumoren; -, es entstanden keine Tumoren.



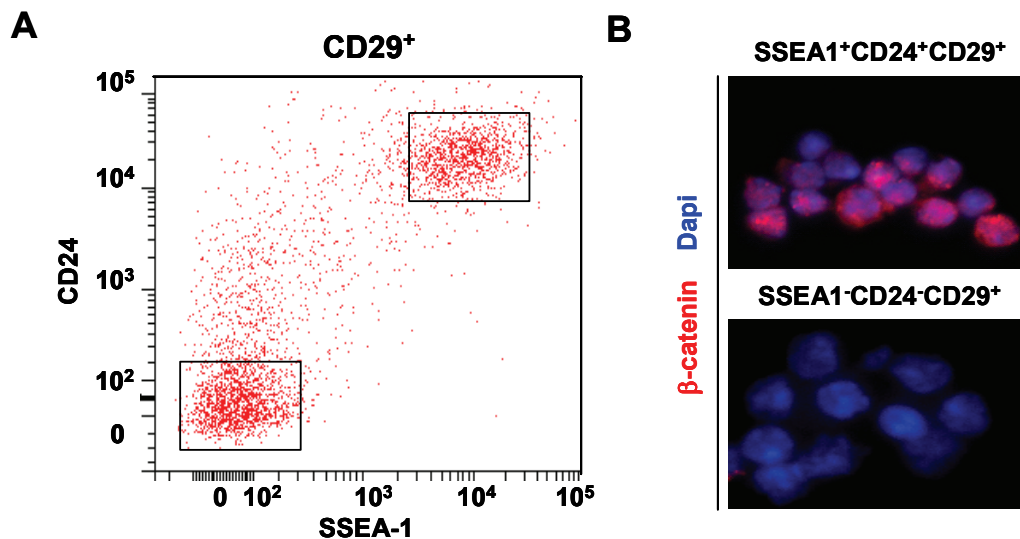
**Abb. 11: Cytokeratin 10-Expression in transplantierten Tumoren von CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Krebsstammzellen in NOD/SCID-Mäusen.** Cytokeratin 10 (CK10, ein Marker für Plattenepithelkarzinome [250]) war verstärkt in differenzierten (A), aber nur sehr wenig in undifferenzierten (B) Bereichen der Tumoren exprimiert. Immunfluoreszenz von Gewebeschnitten (CK10 in rot, nukleäres Dapi in blau). In den differenzierten Bereichen der transplantierten Tumoren (A) erkennt man Speicheldrüsengang-artige Strukturen.

### ***Die Krebsstammzellen aus doppelt-mutanten Speicheldrüsen exprimieren Pluripotenz-Gene***

Es ist von großem Interesse zu verstehen, wie sich Gewebe-Stammzellen in hochproliferative und aggressive Krebsstammzellen umwandeln. Ein Mechanismus dazu wurde in der Literatur von anderen Gruppen diskutiert, nämlich dass Krebsstammzellen Eigenschaften von embryonalen Stammzellen annehmen, z. B. die Expression von typischen Markern für Pluripotenz [15,261]. Mit FACS konnte nachgewiesen werden, dass doppelt-mutante CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Krebsstammzellen der Speicheldrüse den Oberflächenmarker SSEA-1/CD15 exprimieren (Abb. 12A). Dies ist einer der frühesten Marker während der Induktion pluripotenter Stammzellen (iPS) und konnte auf Krebsstammzellen von Medulloblastomen identifiziert werden [21,262,263]. Wildtypische und einfach-mutante Speicheldrüsen-Zellen exprimierten diesen Marker nicht (nicht gezeigte Daten). Eine weitere wichtige Erkenntnis war, dass die dreifach-sortierten SSEA-1<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Krebsstammzellen der Speicheldrüse einen sehr hohen Grad an nukleären  $\beta$ -Catenin aufwiesen (> 90%), was auf starke Aktivität des Wnt/ $\beta$ -

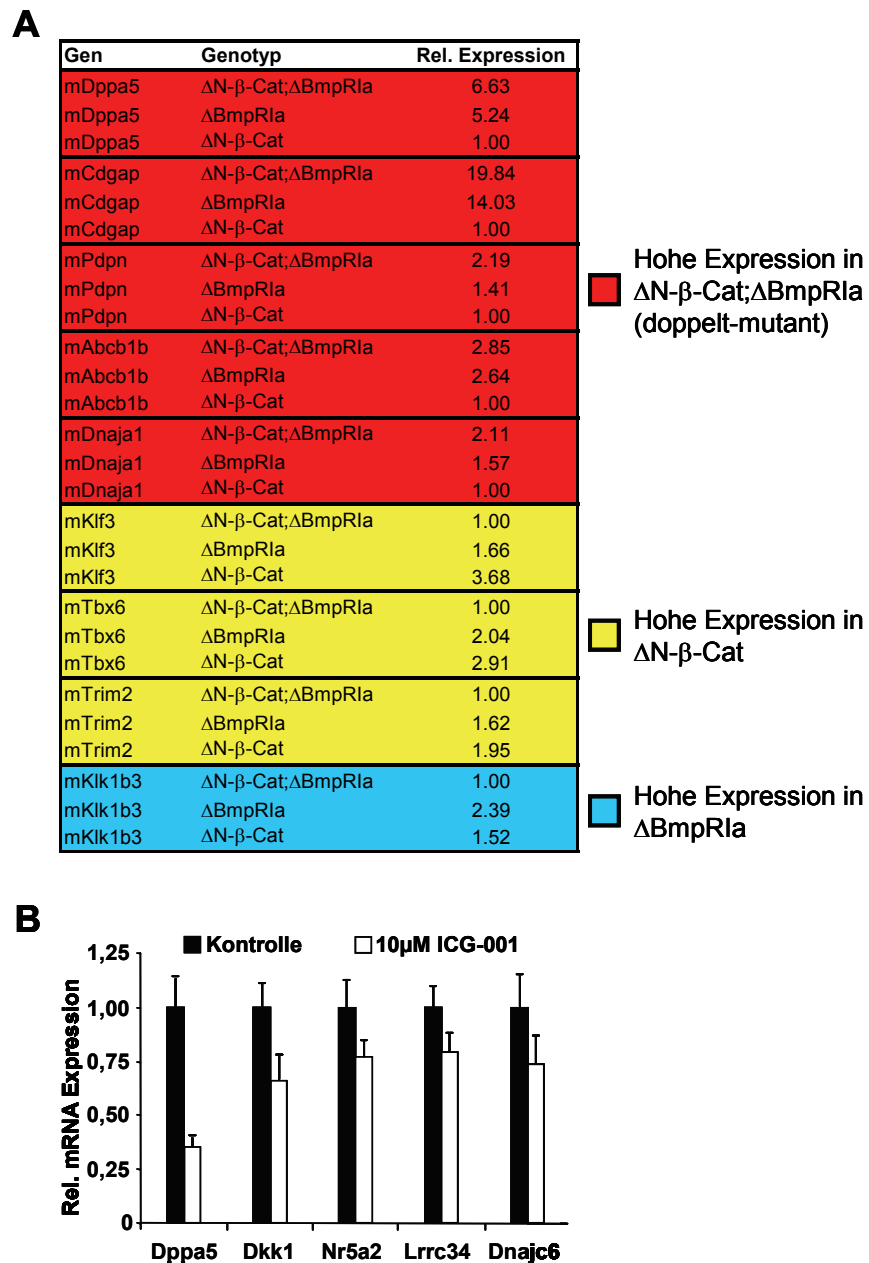


Catenin-Signalweges in dieser Zellpopulation hinweist (Abb. 12B). Dagegen war in SSEA-1<sup>-</sup>-Zellen kaum nukleäres  $\beta$ -Catenin nachweisbar (Abb. 12B).



**Abb. 12: Expression von SSEA-1 und hohe Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalaktivität in den Krebsstammzellen der doppelt-mutanten Speicheldrüsen. (A)** FACS-Analyse von CD29<sup>+</sup>-Zellen der Speicheldrüsen-Tumoren für die zusätzlichen Marker CD24 und SSEA-1. Hoch oder niedrig exprimierende Zellen sind durch Rechtecke markiert. **(B)** Immunfluoreszenz-Analyse der dreifach-sortierten SSEA-1<sup>+</sup> und SSEA-1<sup>-</sup> Subpopulationen (markiert durch Rechtecke in Abb. 12A) für nukleäres  $\beta$ -Catenin (in rot, nukleäres Dapi in blau).

Die CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Krebsstammzellen zeigten auch eine stark erhöhte Expression von anderen Genen, die charakteristisch sind für den Prozess der Selbsterhaltung von ES-Zellen. Dies wurde durch eine Affymetrix-Microarray-Untersuchung und durch quantitative Echtzeit-PCR nachgewiesen (Abb. 13A). Zu solchen Genen zählt beispielsweise Dppa5 [264,265]. Das RNA-bindende Protein Dppa5 wird spezifisch in pluripotenten Zellen exprimiert. Dieser DNA-Locus kann epigenetisch abgeschaltet sein und ist sensitiv für Inhibitoren, die Stammzeleigenschaften induzieren können, wie z. B. Histon-Deazetylase (HDAC)-Inhibitoren [265]. Diese Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten Krebsstammzellen der Speicheldrüse besondere Pluripotenz-Marker exprimieren und dass dies positiv mit einer möglichen Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges korreliert ist [107,266]. Die Krebsstammzellen besitzen zudem eine spezifische Gensignatur, die sie klar von den Stammzellen der einfach-mutanten Mäuse abgrenzt (Abb. 13A).



**Abb. 13: Expression von Pluripotenz-Genen in den Krebsstammzellen der doppelmutanten Speicheldrüsen und Abhängigkeit vom Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg. (A)** Spezifische Gensignatur der doppelmutanten  $CD24^+CD29^+$ -Krebsstammzellen (rot unterlegt) und der jeweils einfach-mutanten  $CD24^+CD29^+$ -Stammzellen (gelb und blau unterlegt), ermittelt durch Affymetrix-Microarray-Analysen und qPCR. Die relativen Gen-Expressionen wurden auf den Genotyp mit dem jeweils niedrigsten Expressions-Niveau normiert (mit 1.00 angegeben). **(B)** Verminderte Expression verschiedener Pluripotenz-Gene in  $CD24^+CD29^+$ -Krebsstammzellen nach Behandlung mit dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Inhibitor ICG-001. Die mRNA-Expressionen wurden mittels qPCR bestimmt. Das Diagramm zeigt die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3).

Weiterhin haben wir untersucht, welche Bedeutung der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg für die Expression dieser ES-Zell-Gensignatur besitzt. Zu diesem Zweck wurde ICG-001 verwendet, ein spezifischer  $\beta$ -Catenin/CBP-Inhibitor [267]. Dieser wurde uns von Prof. Michael Kahn von der Universität Süd-Kalifornien, Los Angeles,

USA, in einer Zusammenarbeit zur Verfügung gestellt. Es konnte gezeigt werden, dass bereits nach 24-stündiger Behandlung der Krebsstammzellen mit ICG-001 die Expression von Dppa5, aber auch anderer Pluripotenzmarker herunterreguliert werden konnte (Abb. 13B).

### ***Das Chromatin der Krebsstammzellen zeigt ein spezifisch verändertes Methylierungsmuster***

Da der Prozess der Selbsterneuerung von ES-Zellen eng mit dem epigenetischen Status korreliert und nach kürzlichen Arbeiten in Krebsstammzellen eine große Bedeutung hat [16,23], wurde das Vorhandensein typischer Chromatinveränderungen in den verschiedenen Stammzellen der Speicheldrüsen bestimmt. Ein charakteristischer Chromatin-Status, der mit repressivem Chromatin und transkriptioneller Inaktivität einhergeht, ist z. B. die dreifache Methylierung von Lysin an der Position 9 und 27 des Histons 3 (H3K9me3 und H3K27me3) [24,25]. Ein weiterer wichtiger Chromatin-Marker, H3K4me3, ist dagegen charakteristisch für geöffnetes Chromatin, was mit aktivierten Promotoren assoziiert werden kann [24,26]. In der vorliegenden Arbeit wurde durch Immunfluoreszenz-Analysen nachgewiesen, dass in den CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Krebsstammzellen der Speicheldrüse eine globale Zunahme von H3K4me3-Methylierungen vorliegt (Abb. 14A, Quantifizierung in 14C). Im Gegensatz dazu war H3K27me3 verstärkt in wildtypischen und einfach-mutanten Speicheldrüsenzellen nachzuweisen, allerdings stark herunterreguliert in den doppelt-mutanten Krebsstammzellen. Die verschiedenen Genotypen zeigten keine Unterschiede in dem Marker H3K9me3. Diese globalen Chromatin-Veränderungen in wildtypischen, einfach-mutanten und doppelt-mutanten Speicheldrüsenzellen konnten durch Western-Blot-Analysen von Kernextrakten bestätigt werden (Abb. 14B). Dabei wurde deutlich, dass transplantierte Tumoren den stärksten Verlust an repressiven Chromatin-Markierungen aufwiesen.

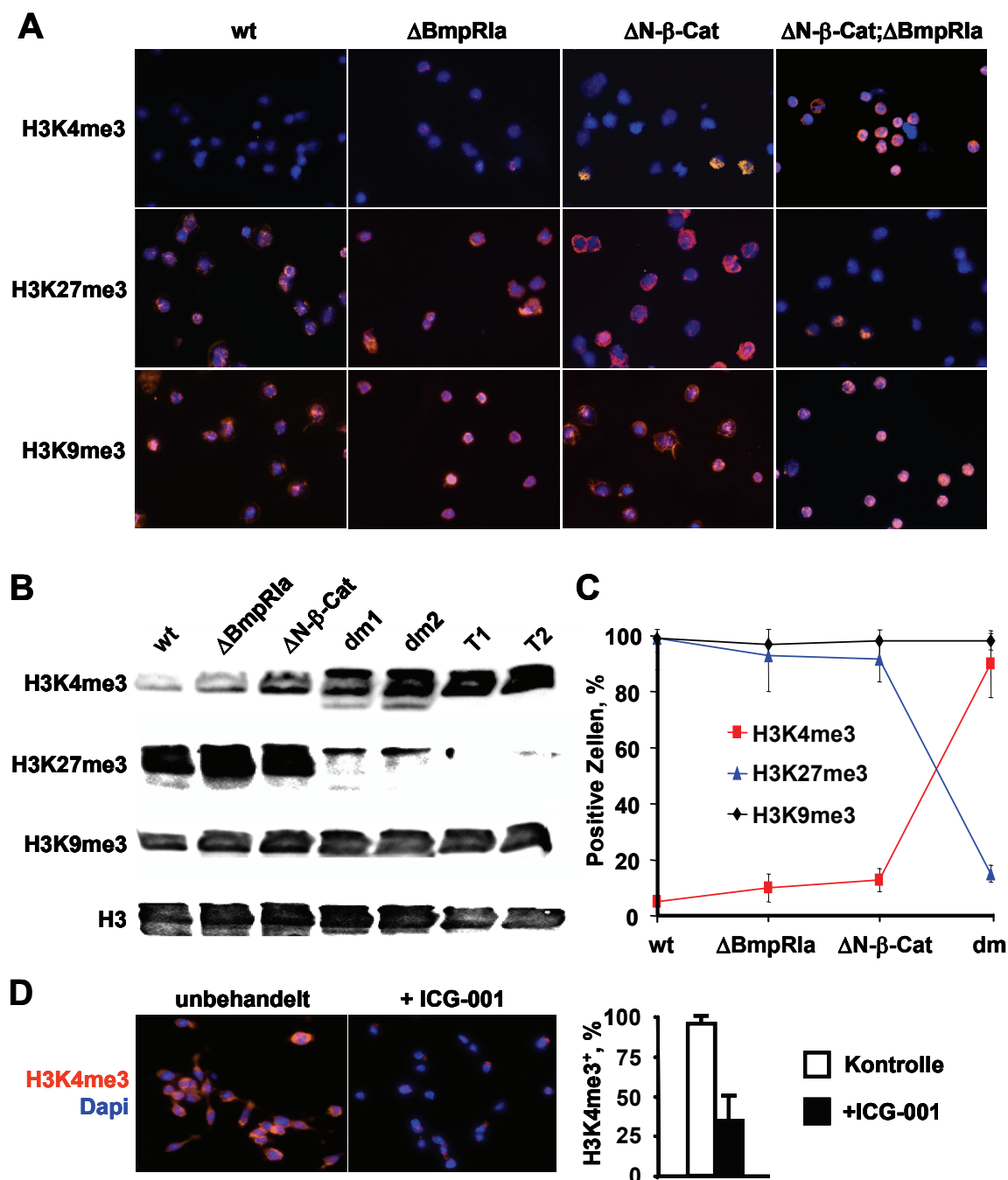
Weiterhin wurde untersucht, ob die Veränderungen in den Methylierungsmustern durch Inhibierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges mit ICG-001 regulierbar sind. In der Tat zeigte sich, dass durch Behandlung von Krebsstammzellen mit ICG-



001 der Anteil von aktiven, H3K4me3-positiven Chromatin um mehr als 60% reduziert werden konnte (Abb. 14D). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Krebsstammzellen der Speicheldrüsen eine erhöhte Expression solcher Gene aufweisen, die normalerweise typisch für pluripotente Stammzellen sind. Außerdem verdeutlichen die globalen Methylierungsmuster, dass in den Krebsstammzellen eine wichtige epigenetische Zustandsveränderung des Chromatins stattgefunden hat. Diese ist gekennzeichnet durch eine spezifische Kombination aus dem Anstieg aktiven und der Abnahme repressiven Chromatins. Bemerkenswerterweise können diese Veränderungen durch einen spezifischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Inhibitor blockiert werden.

### ***Speicheldrüsen-Krebsstammzellen wachsen in vitro als Salisphären: Effekt von Wnt/ $\beta$ -Catenin-, HDAC- und DNA-Methylierungs-Inhibitoren***

Aus verschiedenen Organen und Tumoren wurden bisher Stammzellen isoliert und als nichtadhärente, sphärenartige Aggregate unter bestimmten Bedingungen kultiviert, z. B. als Neurosphären, Mammosphären oder Salisphären [19,244]. So konnten organotypische, intestinale Strukturen aus einzelnen Stammzellen generiert werden, wobei für deren Kultivierung bestimmte Faktoren wie der Wnt-Aktivator R-spondin, der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), der Bmp-Inhibitor Noggin, ein Rho-Kinase-Inhibitor sowie ein Notch-Agonist essentiell waren[268]. Die in der vorliegenden Arbeit isolierten, doppelt-mutanten CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Krebsstammzellen der Speicheldrüse konnten ebenfalls als Salisphären kultiviert werden. Es zeigte sich, dass der Wnt/ $\beta$ -Catenin Inhibitor ICG-001 die Proliferation der Salisphären blockieren konnte (Abb. 15A). Weder wildtypische noch einfach-mutante CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Speicheldrüsen-Stammzellen konnten bisher als Salisphären kultiviert werden.

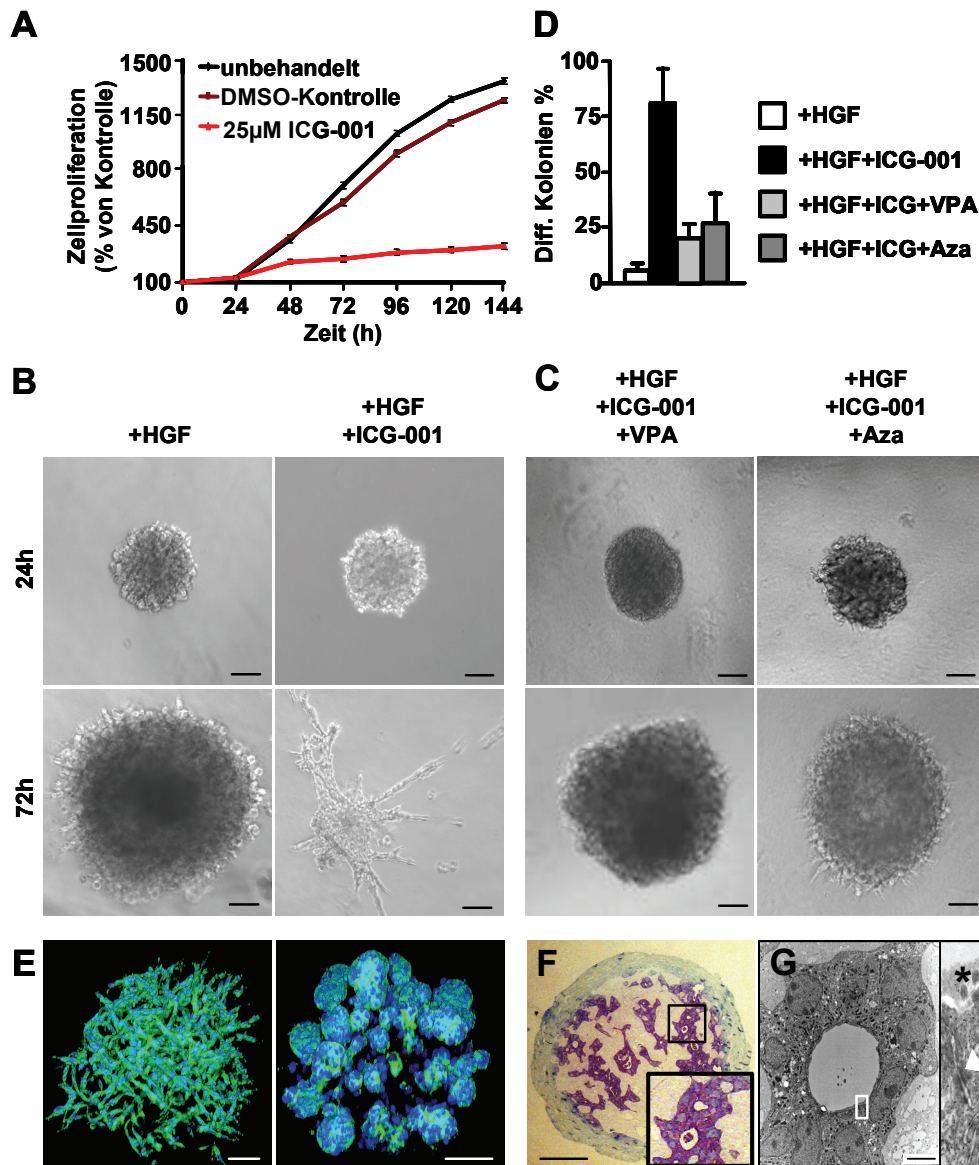


**Abb. 14: Histon-Trimethylierungs-Status von wildtypischen (wt) sowie einfach- ( $\Delta$ N- $\beta$ -Cat oder  $\Delta$ BmpR1a) und doppelt-mutanten ( $\Delta$ N- $\beta$ -Cat; $\Delta$ BmpR1a) Speicheldrüsen-Zellen. (A) Immunfluoreszenz-Analysen für H3K4me3 (Marker für aktives Chromatin) sowie für H3K27me3 und H3K9me3 (beide als Marker für repressives Chromatin beschrieben) von CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Speicheldrüsen-Stammzellen (in rot, nukleäres Dapi in blau). (B) Western-Blot-Analysen für H3K4me3, H3K27me3 und H3K9me3 von wildtypischen (wt) und mutanten Speicheldrüsen (dm1 und dm2 sind zwei Proben von doppelt-mutanten Tumoren) sowie von transplantierten Tumoren (T1, T2). Histon 3 (H3) wurde als Ladekontrolle verwendet. (C) Die Quantifizierung der Experimente aus Abb. 14A zeigt die spezifischen globalen Chromatin-Veränderungen in den Krebsstammzellen der doppelt-mutanten Mäuse (dm) im Vergleich zu wt und einfach-mutanten Mäusen. H3K4me3 (stark erhöht) und H3K27me3 (stark erniedrigt) zeigen eine markante Veränderung in den Krebsstammzellen der doppelt-mutanten Tiere. (D) Verminderte H3K4-Trimethylierung nach Behandlung der Krebsstammzellen mit dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Inhibitor ICG-001 (25  $\mu$ M). Die Quantifizierung des Inhibitor-Experiments ist rechts davon angegeben. Die Diagramme zeigen den jeweiligen Mittelwert und die Standardabweichungen (n=3).**

In weiteren Versuchen wurden die doppelt-mutanten Krebsstammzellen als dreidimensionale Matrigel-Kulturen in Gegenwart von Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) propagiert. HGF wurde in früheren Arbeiten unseres Labors als wichtiger Faktor identifiziert, der Wachstum und organotypische Strukturen von verschiedenen menschlichen Krebszellen in Matrigel/Kollagen-Kulturen induziert [269]. Unter diesen Bedingungen wuchsen die Krebsstammzellen der Speicheldrüsen als lose, netzartige Strukturen (Abb. 15B). Bemerkenswerterweise konnte durch Behandlung der Krebsstammzellen mit dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Inhibitor ICG-001 deren Differenzierung in glanduläre Strukturen eingeleitet werden (Abb. 15B,E,F). Die differenzierten Aggregate zeigten morphologisch große Ähnlichkeit zu Speicheldrüsen-Azini. Mit Elektronenmikroskopie-Untersuchungen wurden weitere typische Strukturen von Speicheldrüsen wie Lumenformation und sekretorische Vesikel nachgewiesen sowie die für epitheliale Strukturen charakteristischen „tight junctions“ (Abb. 15G).

Um aufzuklären, ob die durch den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Inhibitor ICG-001 eingeleiteten Differenzierungsvorgänge durch Veränderungen des Chromatin-Status in den  $CD24^+CD29^+$ -Krebsstammzellen reguliert sind, wurde Valproinsäure als HDAC-Inhibitor verwendet (Abb. 15C). Dabei wurden sowohl die Proliferation als auch das Differenzierungspotential der Salisphären untersucht. Es zeigte sich, dass beide Prozesse durch die Behandlung mit Valproinsäure revertierbar waren, d. h. die Salisphären wieder dem ursprünglich undifferenzierten Zustand entsprachen. Da es zunehmende Hinweise für Wechselwirkungen zwischen DNA-Methylierung und Histonmodifizierungen in der Kontrolle von Stammzellen gibt [23], wurden die Salisphären auch mit dem DNA-Methylase-Inhibitor 5-Azazytidin behandelt (Abb. 15C). Auch hierbei konnten die durch ICG-001-Behandlung induzierten Effekte auf Proliferation und Differenzierung jeweils revertiert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass Prozesse wie Histon-Deazetylierung oder DNA-Methylierung notwendig sind, um die ICG-001-induzierte Differenzierung der Krebsstammzellen einzuleiten. Weiterhin verdeutlicht dies, dass die Krebsstammzellen der Speicheldrüsen ein unbeschränktes Selbsterneuerungspotential besitzen, wofür eine aktive Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalgebung und ein bestimmtes Niveau an aktiviertem Chromatin notwendig sind. Die Differenzierung der  $CD24^+CD29^+$ -Krebsstammzellen in Speicheldrüsen-ähnliche Strukturen

basierte dagegen auf einer globalen Chromatinrepression und korrelierte mit der transkriptionellen Inaktivierung von Pluripotenzgenen.



**Abb. 15: Speicheldrüsen-Krebsstammzellen wachsen als nicht-adhärenente Sphären (Salisphären) und sind sensitiv für Wnt/β-Catenin-, HDAC- und DNA-Methylierungs-Inhibitoren.** (A) Bestimmung der Zellproliferation von CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Krebsstammzellen nach Behandlung mit dem Wnt/β-Catenin-Inhibitor ICG-001 (25 µM in 1% DMSO; n=3). (B,C) Phasen-Kontrast-Mikroskopie von Salisphären in Matrigel-Kulturen nach Behandlung mit Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF, 100 U/ml). Einleitung der Differenzierung von Salisphären nach Behandlung mit ICG-001 (25 µM) und Reversion bei gleichzeitiger Gabe von Valproinsäure (VPA, 4 mM) und 5-Azazytidin (Aza, 4µM). HGF+VPA- und HGF+Aza-behandelte Zellen wuchsen wie undifferenzierte HGF-behandelte Sphären (nicht gezeigt). (D) Quantifizierung der Differenzierungsexperimente mit den Salisphären von Abb. 15B,C nach 72 h. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3). (E) Die losen, netzartig wachsenden Salisphären differenzieren nach Behandlung mit ICG-001 innerhalb von 72 h in glanduläre Strukturen, analysiert mit Immunfluoreszenz für Phalloidin (in grün) und nukleärer Dapi-Färbung (blau). (F) Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines semi-dünnen Schnittes einer differenzierten Salisphäre. Die Einfügung zeigt die Vergrößerung einer Speicheldrüsendgang-ähnlichen Struktur mit Lumenbildung. (G) Lumenformation innerhalb einer differenzierten Salisphäre, untersucht mit Elektronenmikroskopie. Die Vergrößerung auf der rechten Seite zeigt sekretorische Granula (Sternchen) und „tight junctions“ (Pfeil). Maßstab, 100 µm in B,C,E,F; 5 µm in G.

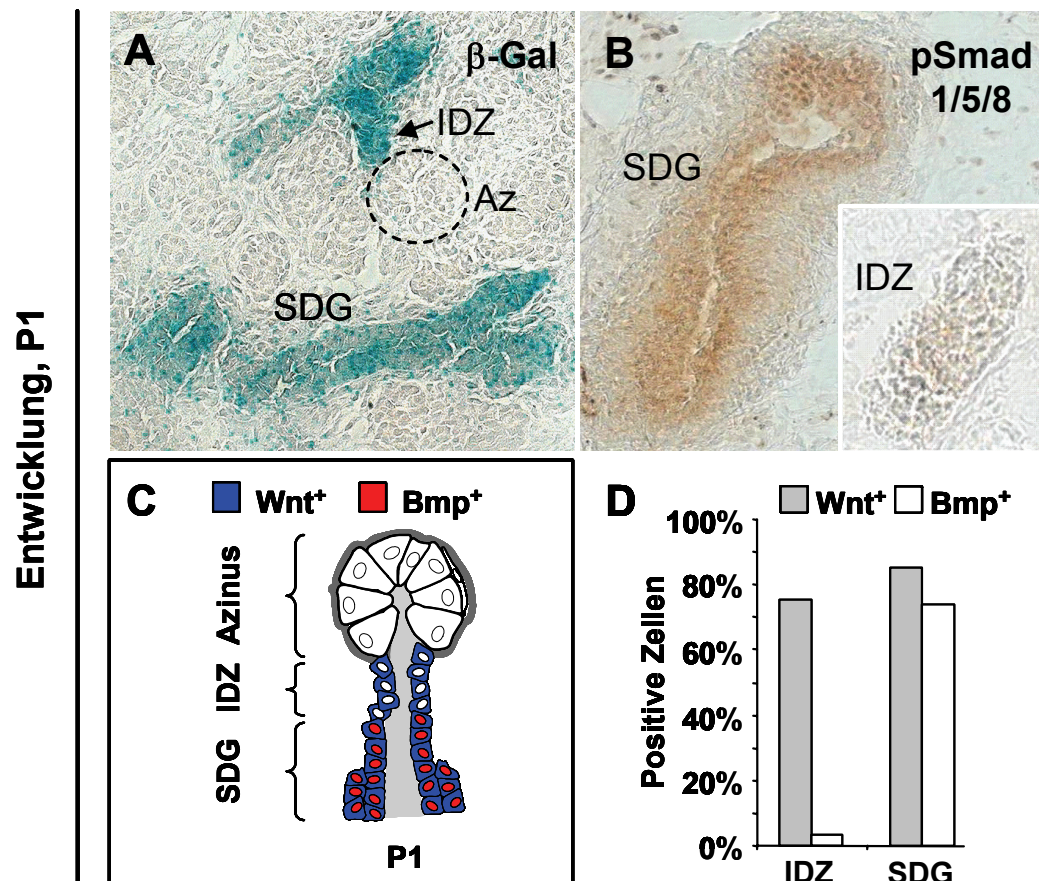
### ***Die Wnt/ $\beta$ -Catenin- und Bmp-Signalgebung in den Stammzellen der Speicheldrüse während der Entwicklung der Maus***

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die gleichzeitige Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges und der Funktionsverlust der Bmp-Signalgebung zur Tumorentstehung in der Speicheldrüse führen. Abschließend wurde untersucht, ob diese Signalaktivitäten auch in anderen Prozessen der Speicheldrüse eine wichtige Rolle spielen, z. B. in der Organentwicklung und Regeneration. Zur Bestimmung von Zellen mit aktivierter Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalübertragung in der sich entwickelnden Speicheldrüse wurden die in unserem Labor hergestellten *Axin2*<sup>LacZ</sup>-Mäuse verwendet, in denen kodierende Sequenzen des *Axin2*-Allels durch eine kodierende LacZ-Sequenzkassette ersetzt wurden [270]. *Axin2* (*Conductin*) ist ein sehr gut charakterisiertes und spezifisches Wnt/ $\beta$ -Catenin/TCF Zielgen [63,271]. Der Nachweis von *Axin2*-LacZ wurde sowohl in unserem Labor als auch weltweit in vielfältigen Untersuchungen zur Bestimmung der Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges in biologischen Systemen genutzt (z. B. in der Entwicklung und Tumورprogression) [14,113,270,272,273,274]. Durch Detektion der Enzymaktivität von  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) auf Gefrierschnitten von *Axin2*<sup>LacZ</sup>-Mäusen wurde die Aktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges zunächst in der sich entwickelnden Speicheldrüse am postnatalen Tag 1 (P1) ermittelt. Dabei konnte anhand der starken blauen Färbung eine hohe Aktivität des kanonischen Wnt-Signalweges in den interkalierenden Speicheldrüsengang-Zellen (IDZ) detektiert werden (Abb. 16A,C, Quantifizierung in Abb. 16D). Die IDZ sind zwischen den Speicheldrüsen-Azini und Speicheldrüsengängen lokalisiert und als Stammzellen-Nische in der Speicheldrüse bekannt [275,276]. Die differenzierten Speicheldrüsengänge (SDG) wiesen ebenso eine starke  $\beta$ -Gal-Färbung auf, wohingegen die Azini keine Reaktivität zeigten (Abb. 16A,C,D).

Der Phosphorylierungsstatus von Smad1/5/8 wurde als typischer Marker für Bmp-Signalaktivität untersucht [140,247]. Phosphoryliertes Smad1/5/8 (pSmad1/5/8) konnte mittels immunohistochemischer Färbung (braun) in der Speicheldrüse an Tag P1 in Zellen ausdifferenzierter SDG nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war die Aktivierung des Bmp-Signalweges in IDZ sehr gering bis nicht nachweisbar (Abb. 16B,C, Quantifizierung in Abb. 16D). Diese Ergebnisse zeigen einen hochaktiven Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg am Tag P1 in den stammzell-

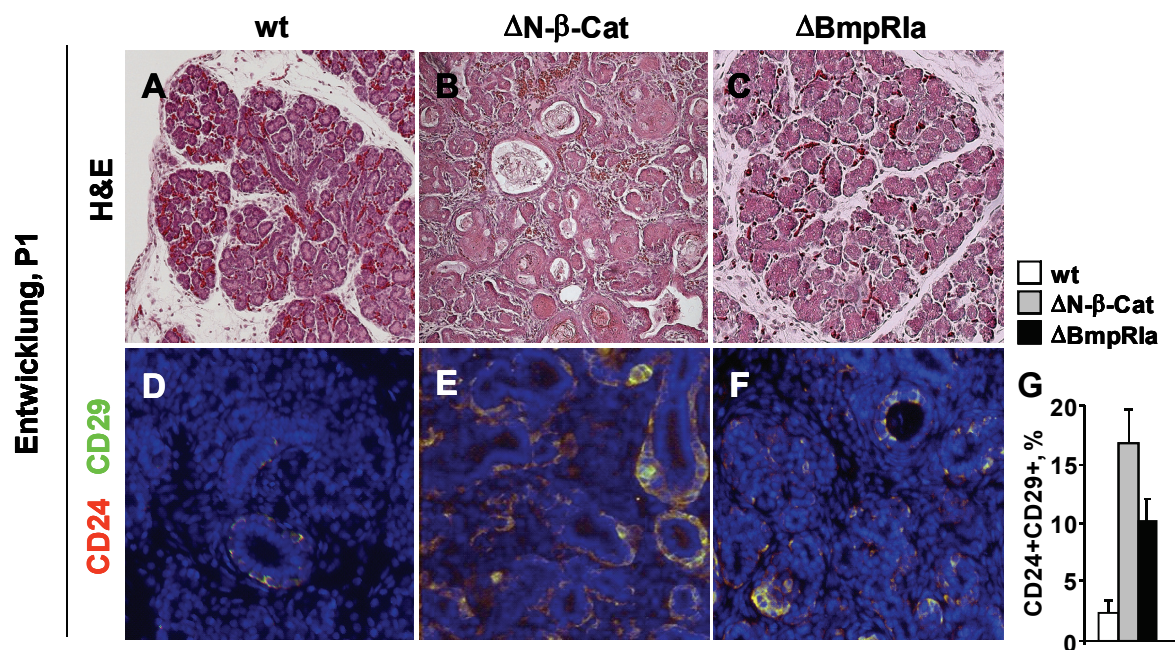


enthaltenden IDZ der sich entwickelnden Speicheldrüse. Im Gegensatz dazu ist die Bmp-Signalgebung in den IDZ unterdrückt. In den Speicheldrüsen-Azini konnte keine Aktivierung sowohl für die Wnt/ $\beta$ -Catenin- als auch für die Bmp-Signalgebung am Tag P1 detektiert werden.



**Abb. 16: Die Aktivitäten der Wnt/ $\beta$ -Catenin- und Bmp-Signalgebung während der Entwicklung der Speicheldrüsen (P1).** (A) Aktivierung der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalgebung in Speicheldrüsen von Axin2<sup>LacZ</sup>-Mäusen ( $\beta$ -Gal-Expression) im IDZ-Stammzellkompartiment (s. Pfeil) und in differenzierten Speicheldrüsenengängen (SDG, Quantifizierung in D, Wnt<sup>+</sup>). Az, Azinus (s. gestrichelter Kreis). (B) Aktivität des Bmp-Signalweges in differenzierten SDG aber nicht in IDZ (s. Einfügung), analysiert mit Immunhistochemie für pSmad1/5/8 (Quantifizierung in D, Bmp<sup>+</sup>). (C) Schematische Darstellung der Strukturen und Aktivitäten der Wnt/ $\beta$ -Catenin- und Bmp-Signalgebung während der Entwicklung der Speicheldrüse (P1). Eine strukturelle und funktionelle Einheit der Speicheldrüse besteht aus einem Speicheldrüsenang (SDG), interkalierenden Duktzellen (IDZ), welche die Stammzellen enthalten, und einem Azinus. Zellen mit aktiver Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalgebung sind blau hervorgehoben (Wnt<sup>+</sup>). Eine aktive Bmp-Signalgebung wird durch rote Zellkerne angezeigt (Bmp<sup>+</sup>). Das Diagramm zeigt die jeweiligen Mittelwerte.

In den folgenden Analysen sollte durch Einsatz der einfach-mutanten Mausmodelle ( $\Delta N$ - $\beta$ -Cat oder  $\Delta BmpR1a$ ) aufgeklärt werden, welche essentielle Bedeutung diese beiden Signalwege für die Stammzell-Nische der Speicheldrüsen und deren Entwicklung besitzen. Speicheldrüsen von Wildtyp-Mäusen an P1 sind durch ein sich stark verzweigendes Epithel gekennzeichnet, das buschartige Strukturen ausbildet und nur einzelne, mit Immunfluoreszenz detektierbare  $CD24^+CD29^+$ -Stammzellen enthält (Abb. 17A,D,G). Die K14-Cre-vermittelte aktivierende  $\beta$ -Catenin-Mutation ( $\Delta N$ - $\beta$ -Cat) resultierte in Hyperproliferation und einer stark erhöhten Anzahl an  $CD24^+CD29^+$ -Stammzellen am Tag P1 im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 17B,E,G). Die konditionale Null-Mutation des Bmp-Rezeptors 1a führte zu diesem Zeitpunkt ebenso zu einer erhöhten Anzahl an  $CD24^+CD29^+$ -Speicheldrüsen-Stammzellen, was jedoch zu keiner veränderten Histologie der Speicheldrüse führte (Abb. 17C,F,G). Die Quantifizierung der  $CD24^+CD29^+$ -Stammzellen anhand von Immunfluoreszenz-Untersuchungen ergab einen fünf- bis siebenfachen Anstieg dieser Zellpopulation in den einfachen Mausmutanten im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 17G).

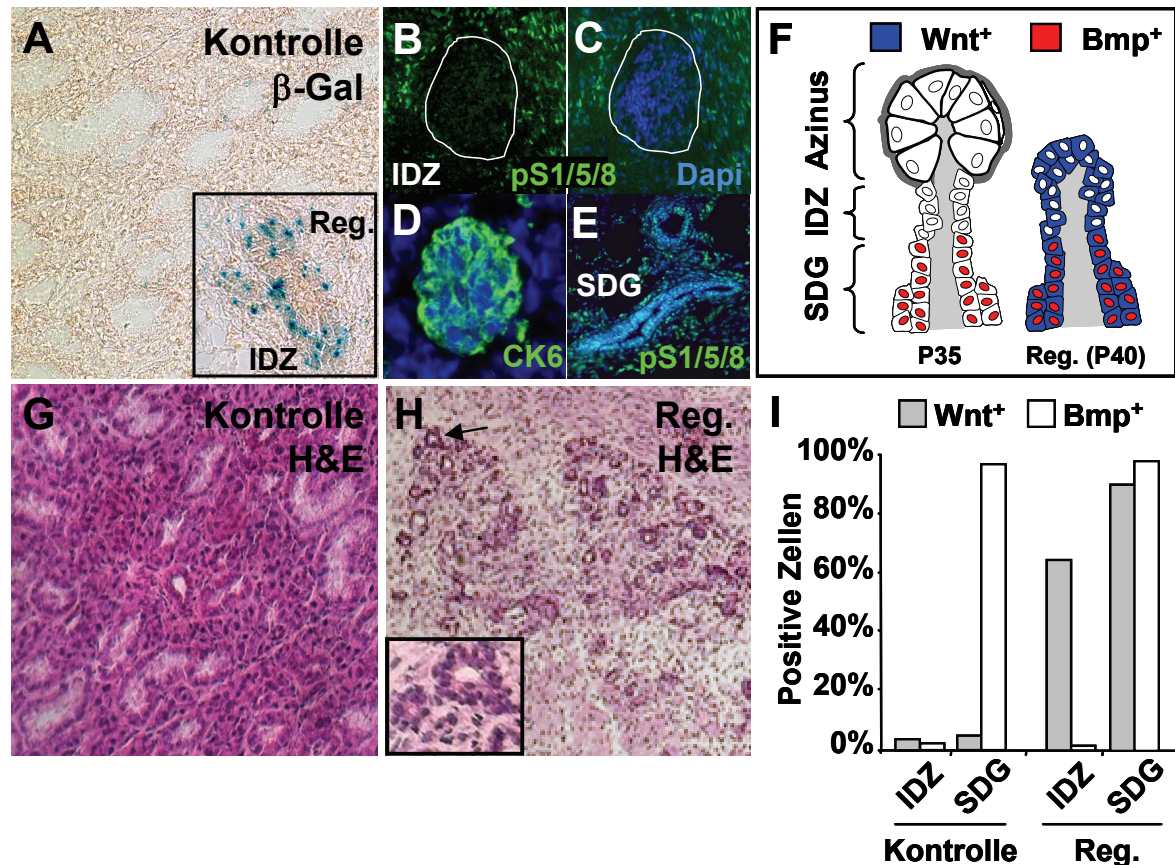


**Abb. 17: Entwicklung der Speicheldrüse in Mäusen mit konstitutiv aktiven  $\beta$ -Catenin bzw. mit BmpR1a-Funktionsverlust (P1).** (A-C) Speicheldrüsen von wildtypischen (wt) sowie  $\Delta N$ - $\beta$ -Cat- oder  $\Delta BmpR1a$ -Mäusen, dargestellt durch Hämatoxylin-Eosin-Färbungen von Gewebeschnitten. (D-G) Nachweis von  $CD24^+CD29^+$ -Stammzellen in wildtypischen,  $\Delta N$ - $\beta$ -Cat- oder  $\Delta BmpR1a$ -Mäusen durch Immunfluoreszenz-Analysen (CD24 in rot, CD29 in grün, Überlagerung in gelb, nukleäres Dapi in blau, Quantifizierung in G). Das Diagramm in G zeigt die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3).

### ***Die Bedeutung der Wnt/ $\beta$ -Catenin- und Bmp-Signalgebung während der Regeneration der Speicheldrüse***

Die Regeneration der murinen Speicheldrüse kann durch Abschnürung (Ligatur) der Hauptspeicheldrüsengänge ab Tag P35 induziert und untersucht werden [257]. Zunächst wurde erneut durch Verwendung der Axin2<sup>LacZ</sup>-Mauslinie analysiert, welchen Aktivierungsstatus die Wnt/ $\beta$ -Catenin- und Bmp-Signaltransduktionswege am Tag P35 (vor der Ligatur) aufweisen. Mittels  $\beta$ -Gal-Färbung konnte gezeigt werden, dass der kanonische Wnt-Signalweg am Tag P35 im gesamten Speicheldrüsengewebe inaktiv ist (Abb. 18A,F,I). Im Gegensatz dazu, und in Analogie zu den Ergebnissen zum Zeitpunkt P1, wurde mittels Immunofluoreszenz-Färbungen gegen pSmad1/5/8 eine aktive Bmp-Signalgebung in den Speicheldrüsengängen, nicht jedoch in den IDZ detektiert (Abb. 18F,I). In Übereinstimmung mit publizierten Daten verschwanden innerhalb der ersten fünf Tage nach Ligatur fast alle azinären Strukturen, welche durch kleine, proliferierende Kanälchen ersetzt wurden (Abb. 18G,H) [257,277]. Bemerkenswerterweise konnte anhand der  $\beta$ -Gal-Färbung eine Reaktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweges in den IDZ während der Regeneration nachgewiesen werden (Einschub in Abb. 18A; Abb. 18F,I). Im Gegensatz dazu blieb die Aktivität des Bmp-Signalweges in den proliferierenden IDZ gering und in den Speicheldrüsengängen hoch (Abb. 18B,C,E,F, I). Die IDZ exprimierten den für frühe proliferative Regenerationsprozesse typischen zellulären Marker Cytokeratin 6 (Abb. 18D) [254]. Die Speicheldrüsengänge zeigten dagegen keine oder nur sehr schwache CK6-Expression (nicht gezeigte Daten). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass während der Regeneration der Speicheldrüse eine hochaktive Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalgebung reaktiviert bzw. eine nur schwach aktive Bmp-Signaltransduktion beibehalten werden muss.

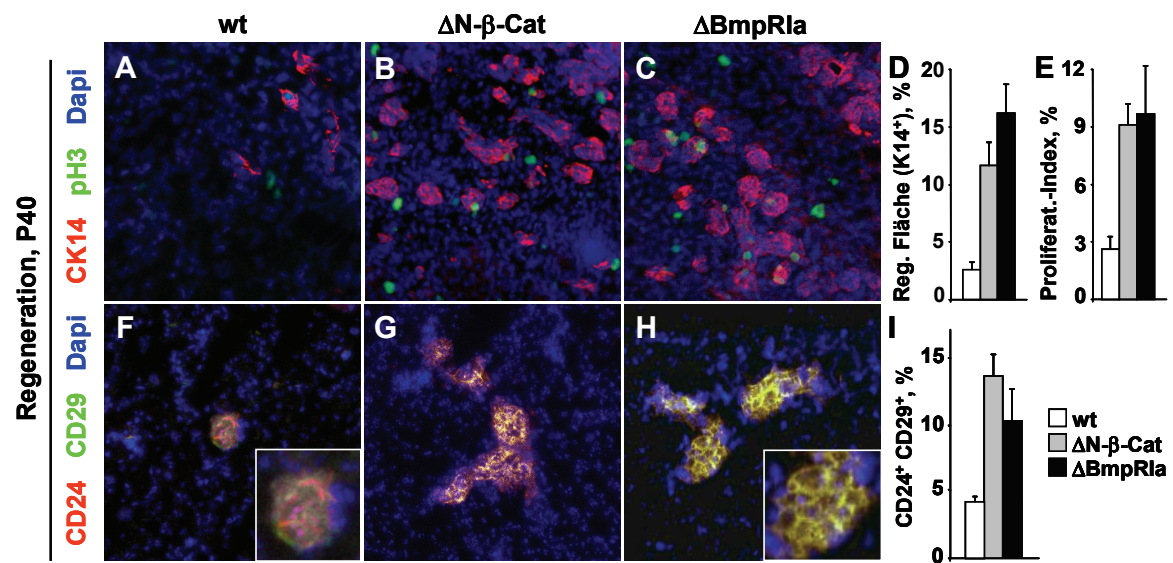




**Abb. 18: Die Aktivitäten der Wnt/ $\beta$ -Catenin- und Bmp-Signaltransduktionswege während der Regeneration muriner Speicheldrüsen.** (A) Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ist in unverwundeten Axin2<sup>LacZ</sup>-Kontrolltieren inaktiv (P35). Die Einfügung in A zeigt die Reaktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges (verstärkte Expression von  $\beta$ -Gal) im Speicheldrüsen Gewebe während der Regeneration am Tag P40 (Quantifizierung in I, Wnt<sup>+</sup>). (B,C) Geringe Aktivität des Bmp-Signalweges in den proliferierenden IDZ während der Regeneration, nachgewiesen mit Immunfluoreszenz-Färbung für pSmad1/5/8 (grün, nukleäres Dapi in blau, Quantifizierung in I, Bmp<sup>+</sup>). (D) Nachweis von CK6 auf einem seriellen Schnitt von B mittels Immunofluoreszenz (in grün, Marker für proliferierendes Epithel, nukleäres Dapi in blau). (E) pSmad1/5/8-Färbung in differenzierten Speicheldrüsen Gängen nach Regeneration (grün). (F) Schema zu den Aktivitäten der Wnt/ $\beta$ -Catenin- und Bmp-Signaltransduktion vor und während der Regeneration der Speicheldrüse (P35 und P40). Zellen mit aktivem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg sind blau (Wnt<sup>+</sup>) dargestellt und eine aktive Bmp-Signalgebung wird durch rote Zellkerne angezeigt (Bmp<sup>+</sup>). (G,H) Hämatoxylin-Eosin-Färbungen von Paraffinschnitten von nicht verwundeten (G) und regenerierenden Speicheldrüsen Gewebe (H). Die Einfügung in H zeigt neu gebildete, kleine Speicheldrüsen Gänge während der Regeneration (Pfeil). Das Diagramm in I zeigt die jeweiligen Mittelwerte.

Die folgenden Untersuchungen sollten klären, ob die Speicheldrüsen-Stammzellen in den einfach-mutanten Mäusen eine funktionelle Bedeutung während der Regeneration übernehmen können. Es zeigte sich, dass beide Mutanten nach Ligatur der Speicheldrüse ein gesteigertes und damit beschleunigtes Regenerations-Potential im Vergleich zum Wildtyp besitzen. Das analysierte Gewebe zeigte einen deutlich erhöhten Anteil an regenerierten und

CK14-positiven Speicheldrüsen-Epithel und der mit phospho-Histon 3 bestimmte Proliferations-Index war erhöht (Abb. 19A-E)[252]. Zusätzlich konnte während der Regeneration eine Vergrößerung der Stammzell-Population beobachtet werden: Die Anzahl der  $CD24^+CD29^+$ -Stammzellen im Wildtyp-Gewebe betrug etwa 4% (Abb. 19F,I). Dagegen konnte in den  $\Delta N$ - $\beta$ -Cat- bzw.  $\Delta BmpR1a$ -Mausmutanten eine 2,5- bis 3,5-fach erhöhte Anzahl von Speicheldrüsen-Stammzellen nachgewiesen werden (10% bis 14%), die in typischen Zell-Clustern auftraten. (Abb. 19G-I). Diese Ergebnisse unterstreichen, dass sowohl die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin- als auch die Inhibierung des Bmp-Signalweges große Bedeutung haben für die Geschwindigkeit der Speicheldrüsen-Regeneration, aber auch für die Größe und Aktivität des Stammzell-Kompartiments während dieses Prozesses.



**Abb. 19: Regeneration der Speicheldrüsen in Mäusen mit konstitutiv aktiven  $\beta$ -Catenin bzw. mit  $BmpR1a$ -Funktionsverlust.** (A-C) Regenerierendes Speicheldrüsen-Epithel von wildtypischen (wt) sowie  $\Delta N$ - $\beta$ -Cat- oder  $\Delta BmpR1a$ -Mäusen, dargestellt durch Immunfluoreszenz-Färbungen für CK14 (in rot, Marker für regeneriertes Epithel; nukleäres Dapi in blau) und phospho-Histon 3 (pH3, in grün, Proliferations-Marker; nukleäres Dapi in blau). Die Quantifizierung der Gewebe-Regeneration und -Proliferation ist in (D,E) zusammengefasst. (F-H) Immunfluoreszenz-Analysen für die Stammzellmarker CD24 (in rot) und CD29 (in grün) in Speicheldrüsen von wildtypischen,  $\Delta N$ - $\beta$ -Cat- oder  $\Delta BmpR1a$ -Mäusen während der Regeneration (Überlagerung in gelb, nukleäres Dapi in blau, Quantifizierung in I). Die Diagramme in D, E und I zeigen die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3).

## Diskussion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Wnt/ $\beta$ -Catenin- und Bmp-Signalwege in der Regulation von Speicheldrüsen-Stammzellen während Tumorentstehung, Organentwicklung und Regeneration eine wichtige Rolle spielen. Es wurde gefunden, dass aggressive Speicheldrüsen-Karzinome im Menschen eine erhöhte Wnt/ $\beta$ -Catenin- und inaktive Bmp-Signalgebung besitzen. Ein Mausmodell wurde etabliert, bei dem die gleichzeitige Aktivierung der Wnt/ $\beta$ -Catenin- und der Verlust der Bmp-Signalgebung ebenfalls Speicheldrüsen-Karzinome verursachten. Diese Tumoren enthielten eine zehnfach erhöhte Anzahl an CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Zellen, die in Transplantations-Experimenten als *bona fide* Krebsstammzellen identifiziert wurden. Die Veränderung nur eines Signalweges, Wnt/ $\beta$ -Catenin oder Bmp allein, führte nicht zu Tumoren, resultierte aber in einer dreifach erhöhten Anzahl von CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Stammzellen in der Speicheldrüse und einer beschleunigten Regeneration nach Verwundung. Im Weiteren wurde gefunden, dass die Krebsstammzellen Pluripotenzgene exprimierten und durch spezifische Methylierungsmuster von Histonen des Chromatins gekennzeichnet waren. Diese epigenetische Veränderung bewirkte die Zunahme aktiven und die Abnahme repressiven Chromatins in den Krebsstammzellen. Die Krebsstammzellen konnten in Salisphären kultiviert werden, welche sich durch chemische Inhibierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges in drüsenartige Strukturen differenzierten. Diese Differenzierung war von repressivem Chromatin abhängig, da DNA-Methylierungs- oder HDAC-Inhibitoren den Krebsstammzell-Status reaktivieren konnten.

### ***Gemeinsamkeiten in Speicheldrüsen-Karzinomen von Mensch und Maus***

Tumoren entstehen, wenn sich in Zellen kritische Mutationen akkumulieren [278]. Dadurch werden wichtige Signalwege in ihrer Aktivität beeinflusst, was zu unkontrolliertem Zellwachstum, Invasivität und Metastasierung führen kann. Die Abfolge der genetischen Veränderungen, die zur Tumorentstehung führen, ist

von Organ zu Organ unterschiedlich. Dies wurde z. B. klar für Tumoren des Darms oder der Haut gezeigt (siehe unten). In dieser Arbeit wurde gefunden, dass eine aktive Wnt/ $\beta$ -Catenin- und inaktive Bmp-Signalgebung eine wichtige Rolle bei der Entstehung von aggressiven Speicheldrüsen-Karzinomen im Menschen spielen. In einem entsprechenden Mausmodell konnte bestätigt werden, dass die gleichzeitige Aktivierung der Wnt/ $\beta$ -Catenin- und der Verlust der Bmp-Signalgebung ebenfalls zu Speicheldrüsen-Karzinomen führt. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass beide Signalwege spezies-übergreifend in der Entstehung dieses Tumortyps wirken können. Diese Daten geben neue Einblicke in die möglichen molekularen Ursachen der Entstehung dieser Tumoren im Menschen, wofür bis jetzt nur sehr wenige Daten erhoben wurden.

Die extreme Aggressivität der Speicheldrüsen-Karzinome der Mäuse war der Grund für den frühzeitigen Tod der Doppel-Mutanten bis zum Tag P90. Im Vergleich zur Entwicklung anderer Tumoren in Mäusen ist dies ein sehr kurzer Zeitraum. Die proliferativen und apoptotischen Indizes der Speicheldrüsen-Karzinomen am Tag P90 zeigten, dass das Netto-Wachstum des Gewebes aufgrund erhöhter Proliferation und unterdrückter Apoptose entstand. Die einfache Null-Mutation des Bmp-Rezeptors *la* verursachte im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle keine Unterschiede in den angeführten Indizes sowie auch nicht in Histologie und Morphologie. In den einfach-mutanten  $\beta$ -Catenin-Mäusen wurde sowohl ein Anstieg der Proliferation als auch der Apoptose nachgewiesen. Die detaillierten Untersuchungen zur Tumorentstehung in den doppelt-mutanten Mäusen verdeutlichen, dass durch den Verlust des Bmp-Signalweges die Induktion der Apoptose ausbleibt. Man kann daraus schlussfolgern, dass der aktivierenden Mutation von  $\beta$ -Catenin in dem hier entwickelten Tumormodell initiale Bedeutung zukommt, und dass die zusätzliche Deaktivierung der Bmp-Signalgebung die Entstehung der Karzinome weiter unterstützt. Dies konnte durch die Expressionsstudien und histologischen Befunde bestätigt werden. Die Bildung von Metastasen konnte im hier verwendeten Mausmodell nicht aussagekräftig genug untersucht werden. Einige Spontan-Metastasen in Lymphknoten und Lunge könnten darauf hindeuten (nicht gezeigte Daten). Eine Erklärungsmöglichkeit wäre der kurze Lebenszeitraum der

Mäuse von nur etwa drei Monaten, der für den Metastasierungs-Prozess nicht ausreicht.

In Übereinstimmung mit anderen Tumorarten ist die alleinige Mutation im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg nicht ausreichend, um maligne Tumoren zu induzieren. Im Fall von Darm-Tumoren ist die Sequenz von tumorfördernden Mutationen inzwischen gut erforscht. Es ist klar, dass aktivierende Mutationen des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges (z. B. in APC oder  $\beta$ -Catenin) die initialen Veränderungen darstellen, die zu benignen Tumor-Vorstufen (Polypen) führen [279]. Zur Progression sind weitere Mutationen in K-RAS, SMAD4 oder p53 notwendig [279]. In der Haut dagegen führen Veränderungen im Hedgehog- oder RAS-Signalweg zur Entstehung von Basalzell- oder Plattenepithel-Karzinomen. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass beide Tumortypen der Haut auch auf eine aktive Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalgebung angewiesen sind und sich nach deren Inaktivierung zurückbilden [14,280]. Es erscheint also folgerichtig, dass die alleinige Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges in der Haut lediglich zu benignen Haarfollikel-Tumoren führt [127].

### ***Die CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Zellen in den Speicheldrüsen-Tumoren der Maus sind Krebsstammzellen***

Ein wichtiges Merkmal der Speicheldrüsen-Tumoren in den doppelt-mutanten Mäusen war die hohe Anzahl von CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Stammzellen, deren Anteil von 1% im Wildtyp-Gewebe auf 3% in den jeweiligen einfach-mutanten Mäusen und auf bis 10% in den Tumoren anstieg. Dies bedeutet, dass eine aktive Wnt/ $\beta$ -Catenin- und inaktive Bmp-Signalgebung kooperieren, um die Anzahl der CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Stammzellen in den Tumoren der Speicheldrüse zu steigern. Es ist bereits aus anderen Organsystemen bekannt, dass die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges die Anzahl von Krebsstammzellen erhöhen kann, z. B. in der Kontrolle von Krebsstammzellen in der Milchdrüse und der Epidermis. So wurde gezeigt, dass die Anzahl der CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Stammzellen in Milchdrüsen von Mäusen mit Wnt1-Überexpression mehr als sechsfach erhöht ist [259]. In

Hauttumoren steigt die Population von CD34<sup>+</sup>-Haarfollikel-Stammzellen bis zu neunfach an, die durch chemische Kanzerogenese (Behandlung mit Dimethylbenzanthracen [DMBA] und 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat [TPA]) oder durch Überexpression von H-Ras induziert wurden [14]. Die CD34<sup>+</sup>-Zellen der Tumoren konnten in Transplantations-Experimenten als Krebsstammzellen identifiziert werden, da ihr tumorigenes Potential 100-fach höher war, als das unsortierter Tumorzellen [14]. Weiter wurde gezeigt, dass die Bmp-Signalgebung einen sehr bedeutsamen Einfluss auf die CD133<sup>+</sup>-Tumorstammzell-Population in Glioblastomen ausübt. Die Aktivierung von Bmp-Signalen führte zur Suppression der Krebsstammzellen, was sich in verringerter Proliferation und der Induktion neuronaler Differenzierung äußerte [281]. Auch andere Signalwege wie Notch oder Hedgehog übernehmen in der Kontrolle von Krebsstammzellen entscheidende Funktionen. So reguliert der Notch-Signalweg das Stammzell-Kompartiment der Milchdrüsen, indem die Überaktivierung von Notch zum Anstieg CD61<sup>+</sup>-luminaler Vorläuferzellen sowie zu Hyperplasie und Tumorentstehung führt [282]. Der Hedgehog-Signalweg ist essentiell für die Selbsterneuerung von c-Kit<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>-Krebsstammzellen bei chronischen myeloiden Leukämien (CML). Der Verlust der Hedgehog-Signalaktivität kann die Entstehung von CML verhindern [283].

In dieser Arbeit wurden Beweise dafür gesucht, ob die CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Stammzellen aus den Speicheldrüsen-Tumoren tumorinitiierende, d. h. Krebsstammzell-Eigenschaften besitzen. Krebsstammzellen und normale Stammzellen weisen eine Vielzahl übereinstimmender Merkmale auf, wie die Fähigkeit zur langfristigen, fast unbegrenzten Selbsterneuerung und Differenzierung sowie ihre Abhängigkeit von einer bestimmten zellulären Umgebung, der (Krebs-) Stammzell-Nische [7,8,9]. Krebsstammzellen können je nach Tumorart etwa 1-15% der Gesamtzell-Population ausmachen, wohingegen der Anteil von normalen Stammzellen im Gewebe normalerweise nicht mehr als 0,1 bis 1% beträgt [19]. Krebsstammzellen können, basierend auf der Expression spezifischer Oberflächenmarker, per FACS isoliert und mit Hilfe klassischer Transplantations-Experimente in immundefizienten Mäusen getestet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden abnehmende Zellzahlen in NOD/SCID-Mäuse transplantiert, um die Tumorigenität der Krebszellen zu bestimmen [18,19]. Die

per FACS angereicherten CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Tumorzellen waren im Vergleich zu den unsortierten Tumorzellen 200-fach tumorigener, d. h. sie produzierten bereits schnell wachsende Tumoren, wenn lediglich 500 Zellen injiziert wurden. Dagegen waren 100.000 unsortierte Zellen gerade noch tumorigen. Der Faktor 200 im tumorigenen Potential ist bemerkenswert, da die angereicherte Tumorzell-Population nur etwa zehnmal mehr CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Zellen enthielt. Die von anderen Wissenschaftlern als „Goldstandard“ für Krebsstammzellen bestimmte Anzahl von transplantierten Tumorzellen beträgt zwischen 100 und 5000 [19]. Somit können wir die CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Zellen aus den Speicheldrüsen-Tumoren unserer doppelmutanten Mäuse als Krebsstammzellen bezeichnen.

Weiter wurde die Frage untersucht, ob die Krebsstammzellen den Primärtumor nach Transplantation histologisch wieder vollständig reproduzierten. In der Tat konnten Cytokeratin 10-positive und Speicheldrüsendrang-artige Bereiche in den transplantierten Tumoren nachgewiesen werden. Allerdings fiel auf, dass die transplantierten Tumoren histologisch oft undifferenziert waren und den Primärtumor nicht vollständig reproduzieren konnten. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Krebsstammzellen in die Haut, also nicht in orthotopes Gewebe transplantiert wurden und deswegen keine optimalen Bedingungen seitens der Krebsstammzell-Nische vorlagen [9].

### ***Krebsstammzellen zeigen ES-Zell-Charakteristika und einen veränderten Histon-Code***

Ein erster wichtiger Befund zum Mechanismus der Entstehung von Krebsstammzellen in den Speicheldrüsen war, dass sie den embryonalen Stammzellmarker SSEA-1 sehr stark exprimierten. SSEA-1 ist einer der ersten typischen Marker, die während der Induktion pluripotenter Stammzellen aus Fibroblasten (iPS) exprimiert werden [262,263]. SSEA-1 wurde kürzlich ebenso als Marker für aggressive Krebsstammzellen in Medulloblastomen nachgewiesen [21]. Eine Microarray-Analyse der CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Krebsstammzellen zeigte weiter, dass die Expression von Dppa5 und anderer potentieller Pluripotenz-Gene in den



Speicheldrüsen-Krebsstammzellen erhöht ist. Anscheinend sind in unseren Krebsstammzellen bestimmte Programme aktiv, die sonst nur für pluripotente ES-Zellen charakteristisch sind. Bemerkenswerterweise ist dieses neue, veränderte Genexpressions-Programm von einer aktiven Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktion abhängig: Die Behandlung der CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Krebsstammzellen mit dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Inhibitor ICG-001 führte nicht nur zu einer stark verlangsamten Zellproliferation, sondern auch zur verringerten Expression von Dppa5 und weiterer prototypischer ES-Zell-Gene.

Normalerweise ist der Dppa5-Locus in ausdifferenzierten Zellen epigenetisch abgeschaltet [265]. Nach unseren Daten ist Dppa5 jedoch in den Speicheldrüsen-Krebsstammzellen transkriptionell reaktiviert. Dies ließ vermuten, dass sich Veränderungen der Chromatinstruktur in den Krebsstammzellen ereignet haben. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass pluripotente und sich aktiv teilende Stammzellen eine typische Chromatinstruktur besitzen: Stammzellen zeigen oft ein leicht zugängliches Chromatin mit aktivierten Promotoren, was mit einer Trimethylierung von Lysin 4 des Histons H3 (H3K4me3) einhergeht [24,26]. Hingegen wurden H3K9me3 und H3K27me3 als repressive Chromatin-Markierungen identifiziert, die mit transkriptioneller Inaktivität korrelieren [24]. In der Tat konnte in den Speicheldrüsen-Tumoren und den CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Krebsstammzellen unserer doppelt-mutanten Mäuse ein starker Anstieg von H3K4me3 und gleichzeitig eine massive Verringerung von H3K27me3 im Vergleich zu wildtypischen und einfach-mutanten Speicheldrüsenzellen nachgewiesen werden. Es zeigte sich weiter, dass ein hoher H3K4me3-Status neben dem Verlust der Bmp-Signaltransduktion von einem aktiven Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg abhängig ist. Nach Behandlung der Krebsstammzellen mit dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Inhibitor ICG-001 wurde H3K4me3 stark herunterreguliert. Die Proliferation von Tumorzellaggregaten in Kultur, den Salisphären von CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Krebsstammzellen, ist ebenso von einem aktivierten Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg abhängig. Nach chemischer Inhibierung verlangsamten die Zellen ihr Wachstum deutlich und begannen sich in glanduläre Strukturen auszudifferenzieren. Dies ist bemerkenswert, da nicht nur die Proliferation inhibiert, sondern gleichzeitig auch die Differenzierung eingeleitet wurde. Damit übereinstimmend wurde in einer anderen Studie gezeigt, dass die Inhibierung von



Wnt/ $\beta$ -Catenin im Krebsstammzell-Kompartiment von Hauttumoren ebenso die Proliferation unterdrücken konnte und gleichzeitig Differenzierung induziert wurde [14]. Dies könnte bedeuten, dass Wnt/ $\beta$ -Catenin-abhängige Krebsstammzellen nach Proliferationsstopp andere Programme, wie Differenzierung, reaktivieren können. Die erfolgreiche Eliminierung von Krebsstammzellen wäre ein enormer Fortschritt in der Tumorthherapie, da die Entstehung von Metastasen und Rezidiven oft auf Krebsstammzellen zurückzuführen ist [19,284].

Da die Krebsstammzellen für ihre Selbsterneuerung epigenetisch stillgelegte Loci wieder aktivieren, wurde der Einfluss chromatin-modifizierender Substanzen auf die Differenzierung der Salisphären untersucht. Sowohl der Histon-Deazetylase-Inhibitor Valproinsäure (VPA) als auch der DNA-Methylase-Inhibitor 5-Azacytidin (Aza) waren in der Lage, die durch den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Inhibitor induzierte Differenzierung zu revertieren und die Salisphären wieder in den proliferativen, selbsterneuernden Zustand zurückzusetzen. Das Potential der niedermolekularen Wirkstoffe VPA und Aza während der Induktion pluripotenter Stammzellen erhöhte die iPS-Effizienz bis zu 100-fach [108], d. h. Chromatinmodifizierungen stellen einen grundlegenden Mechanismus während der Reprogrammierung von ausdifferenzierten Fibroblasten in pluripotente Stammzellen dar [285]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass aktivierende Chromatinmodifizierungen auch in der Entstehung von Krebsstammzellen eine bedeutende Rolle einnehmen. Für die Differenzierung der Krebsstammzellen sind also Prozesse wie Histon-Deazetylierung oder DNA-Methylierung notwendig, was in unserem Fall für globale Chromatinrepression und transkriptionelle Inaktivität sprechen würde. Für die Proliferation der CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Krebsstammzellen sind demnach ein aktivierter Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg und ein bestimmtes Maß an geöffnetem Chromatin notwendig.

### ***Die Wnt/ $\beta$ -Catenin- und Bmp-Signalwege sind auch in der Entwicklung der Speicheldrüse von Bedeutung***

Die Entwicklung der murinen Speicheldrüse gliedert sich in einen embryonalen und postnatalen Abschnitt [204]. In dieser Arbeit wurde das postnatale Stadium zum Zeitpunkt P1 näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in den interkalierenden Speicheldrüsengang-Zellen (IDZ) hochaktiv ist. Die IDZ sind bereits aus anderen Studien als Stammzellen-Nische in der Speicheldrüse bekannt [275,276]. Im Gegensatz dazu ist die Bmp-Signalgebung in den IDZ abgestellt. Die Bedeutung eines aktivierten Wnt/ $\beta$ -Catenin- und inaktiven Bmp-Signalweges für die Stammzellen der murinen Speicheldrüse konnte in dieser Arbeit auch durch den Einsatz einer aktivierenden  $\beta$ -Catenin- und Null-Mutation des Bmp-Rezeptors Ia bestätigt werden. So ist eine aktive Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalgebung für die Kontrolle der Anzahl an CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Stammzellen von großer Bedeutung. Interessanterweise führte der Funktionsverlust des Bmp-Signalweges ebenso zu einer erhöhten Anzahl dieser Stammzellen. Dies deutet auf einen Einfluss beider Signalwege auf die Stammzellen und ihre Abkömmlinge hin, der über die Kontrolle der Anzahl der Stammzellen hinausgeht. Im Fall der dauerhaften Aktivierung der Wnt-Signalgebung proliferieren die Zellen weiter und schlagen eine bestimmte Differenzierungsrichtung ein. So konnte histologisch und durch Expressions-Analysen in den einfach-mutanten Mäusen mit aktivierten  $\beta$ -Catenin die Zunahme epithelialer Zellen und damit verbunden, eine erhöhte Expression epithelialer Marker nachgewiesen werden (z. B. Loricrin, Repetin oder Keratin 36). Die Fähigkeit des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges, Stammzellen eines Gewebes in eine bestimmte Differenzierungsrichtung zu dirigieren, ist bereits für andere Organsysteme beschrieben worden. So werden z. B. Zellen der Haarfollikel, aber nicht der Epidermis durch Wnt/ $\beta$ -Catenin induziert (in der Haut), Enterozyten und Paneth-Zellen, aber nicht Goblet-Zellen (im Darm) oder Zellen des zweiten und nicht des ersten Herzfeldes (im Herz) [107].

Ein ähnlicher regulatorischer Einfluss dieser beiden Signalwege konnte bereits im Stammzell-Kompartiment des Darms (den Krypten) nachgewiesen werden, wo ein aktiver Wnt/ $\beta$ -Catenin- und inaktiver Bmp-Signalweg essentiell sind für die

Aufrechterhaltung der adulten, gewebsspezifischen Stammzellen [195,201]. Es handelt sich dabei allerdings nicht um einen generellen Mechanismus, denn in der Haut kontrollieren sich diese beiden Signalwege gegenseitig in einem fein abgestimmten oszillierenden System aus Aktivierung und Inaktivierung und steuern so den Haarzyklus [126,203]. Unsere Daten zeigen zusammengefasst, dass eine aktivierte Wnt/ $\beta$ -Catenin- oder eine inaktive Bmp-Signalgebung die Anzahl der Speicheldrüsen-Stammzellen erhöhen können. Es bestehen jedoch Unterschiede zwischen beiden Signalwegen in ihrem Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung der Abkömmlinge der Stammzellen.

### ***Wnt/ $\beta$ -Catenin- und Bmp-Signalgebung in der Regeneration der Speicheldrüse***

Nach Verwundung der Speicheldrüse und im sich anschließenden Regenerations-Prozess wurde eine Reaktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges im Gewebe und vor allem in den Speicheldrüsen-Stammzellen beobachtet. Die funktionelle Bedeutung für das regenerative Potential der Speicheldrüse konnte in der vorliegenden Arbeit tatsächlich nachgewiesen werden: So führen die aktivierende  $\beta$ -Catenin- oder die Null-Mutation des Bmp-Rezeptors Ia im Speicheldrüsen-Gewebe zu einem Anstieg von CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Speicheldrüsen-Stammzellen und ermöglichen eine stark beschleunigte Regeneration nach Verwundung. Die schnellere Regeneration ist möglich, da die Zunahme der Stammzellen und die sich daraus ergebende beschleunigte Neubildung des Speicheldrüsen-Epithels die dominierenden Prozesse darstellen, die in der akuten Phase der Regeneration nach der Verwundung ablaufen [257,277]. Eine weitere Steigerung des regenerativen Potentials der Speicheldrüse durch die Generierung eines Mausmodells, das sowohl eine aktivierende  $\beta$ -Catenin- als auch die Null-Mutation des Bmp-Rezeptors Ia trägt, konnte nicht untersucht werden. Die doppelt-mutanten Tiere entwickelten bereits am Tag P30 kleine Tumoren und morphologische Veränderungen im Speicheldrüsen-Gewebe, was eine angemessene Überprüfung des regenerativen Potentials verhinderte.

Die große Bedeutung der Wnt/ $\beta$ -Catenin- und Bmp-Signalgebung in regenerativen Prozessen wurde bereits in anderen Organsystemen aufgezeigt. In sich kontinuierlich regenerierenden Geweben, wie z. B. dem Darm, kann man eine vergleichbare Regulation beobachten. Hier benötigen die Stammzellen zu ihrer eigenen Erhaltung und zur ständigen Erneuerung des Darmepithels einen Krypt-Villus-Gradienten aus aktiver Wnt/ $\beta$ -Catenin- und inaktiver Bmp-Signalgebung. Eine Störung in diesem System kann zu verstärkter Proliferation führen und die Entstehung von Tumoren induzieren [122,195,201]. Eine wichtige Funktion übernimmt der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg auch in der Regeneration von verletztem Gewebe oder Organen, beispielsweise nach Leber-Ektomie oder nach Verwundung der Haut. Die Leber ist ein einzigartiges Organ bezüglich des Regenerations-Potentials, da selbst nach der Entfernung von bis zu 70% der Lebermasse eine vollständige Regeneration möglich ist [286]. Einige Studien konnten darlegen, dass der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg für eine geordnete Erneuerung der Leber nach Verletzung wichtig ist und dessen Verlust zu einer eingeschränkten und verlangsamen Regeneration führt [287,288,289]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der kanonische Wnt-Signalweg essentiell ist, um neue Haarfollikel in verwundeten und regenerierten Haut-Arealen zu bilden [290]. Die Bmp-Signalgebung dagegen übernimmt eine herausragende Bedeutung in der Knochen-Regeneration nach Frakturen. So konnte z. B. gezeigt werden, dass Bmp2 für die Frakturheilung essentiell ist, da die Bmp2-Nullmutation in der Maus zur Blockade der frühen Phase der Knochen-Regeneration führt [291]. Exogene Applikationen von Bmp können die Heilung auch beschleunigen und resultieren in einer stabileren Knochenmasse, was in therapeutischen Anwendungen zum Einsatz kommt [292]. Der Bmp-Signalweg übt weiterhin eine essentielle Funktion in der Stammzell-vermittelten Regeneration der Retina aus. Hierbei vermittelt die Bmp-Signaltransduktion in der frühen regenerativen Phase die Proliferation, ist in der späten Phase aber ebenso in der Lage, Apoptose zu induzieren. Dabei kommt es zu komplexen Interaktionen mit dem FGF-Signalweg [293]. Diese Beispiele unterstreichen, dass die Wnt/ $\beta$ -Catenin- und Bmp-Signalwege in verschiedenen Organen für die Kontrolle von Stammzellen in regenerativen Prozessen bedeutungsvoll sind. Bemerkenswerterweise existieren dabei sehr unterschiedliche organspezifische Aktivitäten der beiden Signalwege. Dadurch erhöht sich die Komplexität

regenerativer Therapien deutlich, denn für jedes Gewebe oder Organ muss ein spezifisches Therapiedesign entwickelt werden.

### ***Das Verständnis der regenerativen Prozesse in der Speicheldrüse ermöglicht neue therapeutische Anwendungen***

Einblicke in die Vorgänge während der Regeneration der Speicheldrüse sind von großem therapeutischen Interesse. So kommt es beispielsweise nach Bestrahlung von Tumoren des Kopf- und Nackenbereiches zu einer apoptose-induzierten Atrophie des Speicheldrüsen-Gewebes und zum Verlust der Stammzellen [240]. Eine Abnahme der Stammzell-Aktivität und -Anzahl kann ebenso altersbedingt sein und führt zu Hypo-Salivation oder schließlich zur Trockenheit der Mundhöhle (Xerostomie), wobei dies auch symptomatisch ist für bestimmte Krankheiten (z. B. Sjögren-Syndrom) [294]. Der Funktionsverlust der Speicheldrüsen ist meistens mit weiteren Folgeerkrankungen verbunden, wie gestörtem Geruchs- und Geschmackssinn, erhöhtem Risiko für orale Infektionen, beeinträchtigter Aussprache sowie Problemen beim Kauvorgang. Derzeitige Studien konzentrieren sich deswegen auf die weitere Charakterisierung von Speicheldrüsen-Stammzellen, z. B. deren Isolation und *in vitro*-Propagation, die Transplantation in geschädigtes Gewebe sowie die Optimierung des Regenerations-Prozesses. In einigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Speicheldrüsen-Stammzellen isoliert und als sogenannte „Salisphären“ (in Suspensionskultur) vermehrt werden konnten. Diese Zellen differenzierten *in vitro* in typische Speicheldrüsendrang- oder Azinus-Zellen [244]. Weiterhin konnte *in vivo* gezeigt werden, dass die so angereicherten Zellen in der Lage sind, nach Transplantation in strahlungsgeschädigte murine als auch humane Speicheldrüsen langfristig deren Morphologie und Funktion wiederherzustellen [244]. Ebenso scheint es durch die Behandlung mit geeigneten Medikamenten (DeltaN23-KGF/Palifermin) möglich, die Anzahl und Aktivität der Speicheldrüsen-Stammzellen vor und nach einer Strahlenbehandlung zu erhöhen und so eine schnellere Regeneration zu erzielen [295].

Eine weitere interessante Einsatzmöglichkeit von isolierten Speicheldrüsen-Stammzellen ergibt sich aus ihrem Potential, *in vitro* in bestimmte Zelltypen anderer Gewebe endodermalen Ursprungs differenzieren zu können, z. B. der Leber oder des Pankreas. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Gewebe-Stammzellen aus Organen endodermalen Ursprungs ähnliche Marker und Eigenschaften besitzen und dass möglicherweise eine bisher noch nicht identifizierte gemeinsame Stammzell-Population in diesen Organen existiert [257,296]. Diese ersten vielversprechenden, therapie-orientierten Ergebnisse lassen allerdings keine Aussage darüber zu, welche Signalwege diese Mechanismen steuern. Die in dieser Arbeit verwendeten Mausmodelle könnten in weiteren Studien Aufschluss darüber geben, ob ein aktivierter Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg oder eine Suppression der Bmp-Signalgebung neben der Kontrolle der CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Speicheldrüsen-Stammzellen auch in der Lage sind, die o. g. Prozesse positiv zu unterstützen. Es wäre interessant zu klären, ob wichtige Faktoren direkt durch diese Signalwege kontrolliert werden. So sind einige bekannte Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren, z. B. FGF4, FGF18, VEGF, EGF-Rezeptor oder Met, die in der Gewebe-Regeneration eine wichtige Rolle übernehmen, direkte transkriptionelle Zielgene des kanonischen Wnt-Signalweges. Außerdem stellt sich die Frage, ob die bisher verwendeten Kultivierungs-Methoden von isolierten Speicheldrüsen-Stammzellen durch den Einsatz geeigneter Aktivatoren des Wnt/ $\beta$ -Catenin- bzw. Inhibitoren der Bmp-Signalgebung optimiert werden können. Kürzlich wurde dies erfolgreich für Lgr5<sup>+</sup>-Stammzellen des Darmes etabliert, wodurch sich neue Ansätze für die regenerative Medizin und Therapie von Darm-Erkrankungen ergeben könnten [268].

### **Relevanz dieser Arbeit**

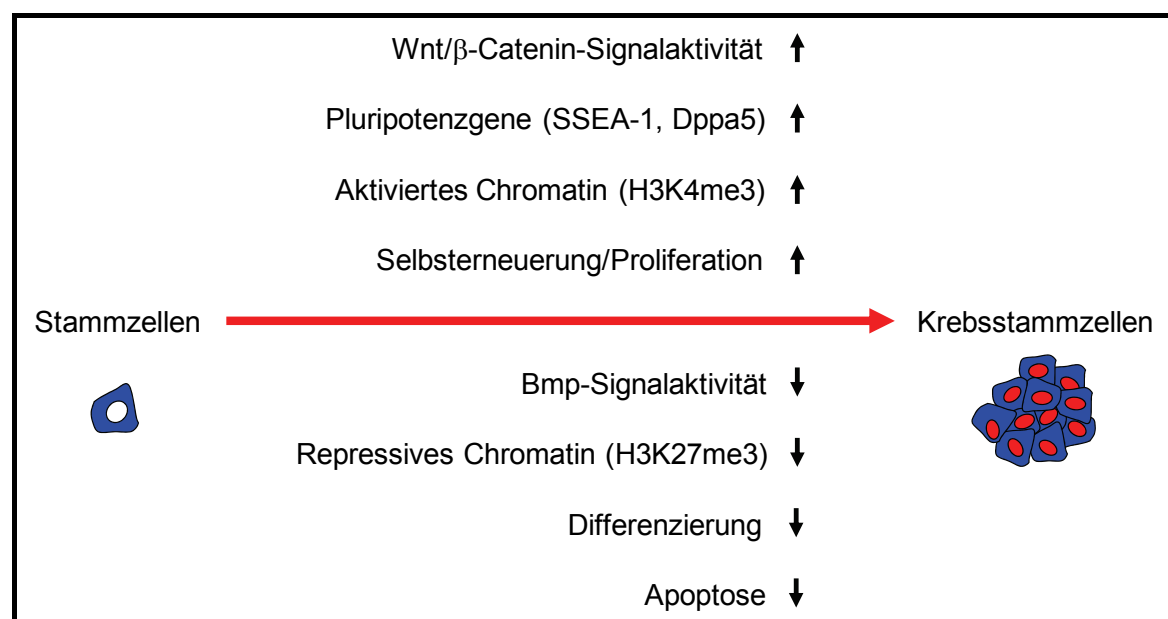
Diese Arbeit zeigt, dass die Wnt/ $\beta$ -Catenin- und Bmp-Signalwege in der Speicheldrüse eine bedeutende Rolle spielen, d. h. während der Krebsentstehung, in der Organentwicklung und in der Regeneration. In Analogie zu den Signalaktivitäten in humanen Speicheldrüsen-Karzinomen wurde ein Mausmodell entwickelt, das neue Einblicke in die Mechanismen und Unterschiede von Tumorentstehung und Regeneration der Speicheldrüse vermittelt. Die gewonnenen Erkenntnisse liefern Ansätze für Behandlungen von Speicheldrüsen-Karzinomen durch chemische Substanzen. Darüber hinaus wurde deutlich, dass es in Zukunft möglich sein könnte, gezielt Stammzellen der Speicheldrüse zu isolieren, um sie in regenerativen Therapien einzusetzen.

Die wichtigsten Schlussfolgerungen dieser Arbeit sind die Folgenden (Abb. 20):

1. Die gesteigerte Aktivität der Wnt/ $\beta$ -Catenin- oder der Funktionsverlust der Bmp-Signalgebung bewirkt eine Zunahme der Speicheldrüsen-Stammzellen in der Maus, was eine beschleunigte Gewebe-Regeneration nach Verwundung ermöglicht.
2. Die Kombination beider Mutationen führt zur Entstehung von doppelt-mutanten CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Krebsstammzellen und schnell wachsenden, transplantierbaren Tumoren.
3. Die Krebsstammzellen besitzen Eigenschaften embryonaler Stammzellen, wie ständige Selbsterneuerung, die Expression von Pluripotenzmarkern (SSEA-1, Dppa5) und einen spezifischen Chromatinstatus (verstärkt H3K4me3 und wenig H3K27me3), der mit aktiven Promotoren und geöffnetem Chromatin korreliert. Dies ist der ursächliche Mechanismus für das unterschiedliche Verhalten der Stammzell-Populationen.
4. Die Krebsstammzellen der Speicheldrüse können durch Behandlung mit einem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Inhibitor in der Proliferation stark gehemmt und zur Differenzierung angeregt werden, was beweist, dass Krebsstammzellen durch niedermolekulare Wirkstoffe gezielt beeinflusst werden können.

Dvorak postulierte 1986, dass Tumoren Wunden seien, die niemals heilten [297]. In der vorliegenden Arbeit wurde klar, dass die Persistenz der Signalweg-

Aktivierung und die Anzahl der Stammzellen die Entwicklung eines Gewebes determinieren. Während eines Heilungsprozesses steigen die Aktivität der Stammzellen und der Signalwege transient an, wohingegen in der Tumorentstehung die Krebs-Stammzellen und die Signalwege permanent überaktiviert bleiben. Es ist wahrscheinlich die ständige Aufrechterhaltung von repressivem Chromatin (H3K27me3) in den normalen Stammzellen, welche zusätzliche aktivierende Chromatin-Modifizierungen verhindert. Dadurch differenzieren die neu entstehenden Zellen, und die weitere Proliferation wird verhindert. In den Krebsstammzellen liegt dagegen ein geöffnetes und aktives Chromatin vor (H3K4me3), welches die ständige Selbsterneuerung ermöglicht und die Differenzierung nur unter bestimmten Bedingungen erlaubt; z. B. bei Inhibierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges.



**Abb. 20: Mechanismus des Übergangs von normalen Stammzellen zu Krebsstammzellen in der Speicheldrüse.** Die Kombination aus erhöhter Wnt/ $\beta$ -Catenin- und erniedrigter Bmp-Signalgebung führt zur Entstehung von Krebsstammzellen und schnell wachsenden Tumoren. Die Krebsstammzellen besitzen Eigenschaften embryonaler Stammzellen, wie ständige undifferenzierte Selbsterneuerung, die Expression von Pluripotenzmarkern (SSEA-1, Dppa5) und einen spezifischen Chromatinstatus, der mit aktiven Promotoren und geöffnetem Chromatin korreliert (H3K4me ↑, H3K27me3 ↓).



## Material und Methoden

### ***Molekularbiologische Standardmethoden, Kits und Chemikalien***

Die im folgenden nicht näher beschriebenen Standardmethoden wurden den Laborhandbüchern von Sambroock *et al* .[298] und Ausubel *et al* .[299] entnommen (Plasmid-DNA-Präparation im analytischen Maßstab, Restriktion von DNA mit entsprechenden Enzymen, Dephosphorylierung linearisierter DNA, Phenol-Chloroform-Extraktion zur Aufreinigung linearisierter Plasmid-DNA, Transformation von Bakterien, Nukleinsäure-Auftrennung in Agarose-Gelen). Entsprechend den Herstellerangaben wurden Kits für folgende Methoden verwendet: Plasmid-DNA-Präparation im quantitativen Maßstab (Qiagen), Elution von DNA aus Agarose-Gelen, Digoxigenin-Markierung von RNA-Sonden (Roche) und deren Aufreinigung mittels RNeasy Kit (Qiagen), Immunhistochemie mit DakoCytomation EnVision+ System-HRP DAB (DAKO). Soweit nicht anders angegeben wurden Chemikalien von Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) eingesetzt; Enzyme und Marker wurden von Boehringer Mannheim (Mannheim), Promega (Mannheim) und New England Biolabs (Schwalbach/Taunus) sowie Oligonukleotide von BioTeZ (Berlin) oder Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

### ***Verwendete Geräte***

Folgende Geräte wurden für die Versuche verwendet: PCR-Gerät (Biometra T3, Thermocycler), Zentrifugen (Minifuge RF und Megafuge 3.0R, Heraeus Sepatech; Centrifuge 5402, Eppendorf; Zentrifuge Variofuge 3.0R, Heraeus; Zentrifuge J2-21 mit Rotoren JA 10 und JA 12, Beckman; Zytocentrifuge Shandon Elliot Cytospin, Shandon), Paraffin-Ausgießstation EC 350 (Microm), Mikrotome (Microm HM400R, HM355S und HM560), Mikroskope (StemiSV11 Apo, Axioskop und Axio Imager.Z1m von Zeiss und LAS AF6000 von Leica), iQ5 Echtzeit-PCR-Detektions-System (Biorad), Spectrophotometer (Nano-Drop ND-1000, Peqlab; Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences), Ultra-Turrax T25 (IKA Labortechnik), Gel-Dokumentationssystem INFINITY-3000 (Vilber Lourmat, Eberhardzell).

### **Bakterienstamm**

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA in Bakterien wurde der konjugationsdefiziente K12-Sicherheitsstamm XL1-Blue von *E.coli* verwendet [Spezifikationen: F', Tn10 (tetr), proAB+, lacIq, (lacZ)M15, supE44, hsdR17, recA1, endA1, relA1, gyrA96].

### **Antikörper und cDNAs**

Folgende Antikörper (AK) wurden verwendet: Rabbit-anti phosphor-Smad1/5/8 (Cell Signaling), Rabbit-anti CK5, Rabbit-anti CK6, Rabbit-anti CK10 und Rabbit-anti CK14 (Covance), Rabbit-anti phospho-Histon H3 (Upstate), Rabbit-anti Cleaved Caspase-3 (Cell Signaling), Mouse-anti  $\beta$ -catenin (BD Transduction Laboratories), Rabbit-anti  $\beta$ -catenin[56] und Mouse-anti BMP4 (R&D Systems), Mouse-anti SSEA-1 (R&D Systems), Rabbit-anti H3K4me3 (Cell Signaling), Rabbit-anti H3K9me (Abcam), Rabbit-anti H3K27me (Millipore), Rabbit-anti H3 (Abcam), Phycoerythrin (PE)-konjugiert CD24 (BD Pharmingen), biotinylierter CD29 (R&D Systems) und Allophycocyanin (APC)-konjugierter CD29 (R&D Systems), Anti-DIG Fab an alkalische Phosphatase gekoppelt (Roche). Folgende sekundäre AK wurden verwendet: POD-gekoppelter Goat-anti Rabbit (aus DAKO EnVision-Kit), Cy2-, Cy3-, Cy5- und Streptavidin-APC-gekoppelte sekundäre AK (Jackson Immuno Research, Invitrogen). Die Kernfärbung wurde mittels DAPI (Sigma) durchgeführt. Für *In-Situ*-Hybridisierungen wurden Anti-sense RNA-Transkripte der murinen cDNAs für Keratin 14 (GenBank Accession Nummer: BC003325, aus Pubmed) verwendet.

### **Verwendete Mauslinien und deren Genotypisierung**

Es wurden die folgenden Mauslinien verwendet:  $\beta$ -Catenin<sup>loxEx3</sup> [122], BmpRla<sup>lox</sup> [249], Keratin14 $\Delta$ neo-Cre [115], Axin2<sup>lacZ</sup> [270] und der Z/AP-Indikator-Stamm [251]. Für die Genotypisierung der Tiere wurde die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Saiki *et al.* (1988) [300] angewendet. Dafür wurden zunächst Ohrbiopsien adulter Mäuse in 30  $\mu$ l Lysepuffer [100 mM Tris pH 8.5, 10 mM EDTA pH 8, 0.2% SDS, 200 mM NaCl, 0,2  $\mu$ g/ $\mu$ l Proteinase K (Sigma)] über Nacht (üN) bei 55°C lysiert. Für die PCR wurden die Ohr-Lysate 1:30 verdünnt,

die entsprechenden PCR-Konditionen und -Programme aus den jeweiligen Publikationen verwendet und folgende PCR- Oligonukleotide eingesetzt (Tab. 4):

**Tab. 4: Oligonukleotide für Genotypisierungs-PCR.**

Mausstamm	Oligonukleotid-Name	Oligonukleotid-Sequenz
$\beta$ -Catenin <sup>loxEx3</sup>	$\beta$ Cat482:	5'- AGAATCACGGTGACCTGGGTTAAA- 3'
	$\beta$ Cat1051n:	5'- CATTCATAAAGGACTTGGGAGGTGT- 3'
BmpRla <sup>lox</sup>	Alk3-fwd:	5'- GGAGACAGGTTTGGATCTTAACCTTAGG- 3'
	Alk3-rev:	5'- GCCTCACTCCTCACCGTGCTC- 3'
Cre	Cre439:	5'- GAACGCACTGATTTCGACCA- 3'
	Cre639:	5'- AACCAGCGTTTTTCGTTCTGC- 3'
Axin2 <sup>lacZ</sup>	Ckoln4:	5'- AAGCTGCGTCGGATACTTGAGA- 3'
	NLS-BJ1:	5'- TGGTAATGCTGCAGTGGCTTG- 3'
	Ex2-AS3:	5'- AGTCCATCTTCATTCCGCCTAGC- 3'
Z/AP	LacZ-144:	5'- TCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAAT- 3'
	LacZ-608n:	5'- ATATCCTGATCTTCCAGATAACTGCCG- 3'

### **RNA-Isolierung**

Die Speicheldrüsen wurden den Mäusen zum jeweiligen Versuchszeitpunkt entnommen, in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Zur Homogenisierung wurden 1,0 ml Trizol-Reagenz (Invitrogen) zugegeben, das Gewebe mit einem Ultra-Turrax aufgeschlossen und die RNA mit Trizol-Reagenz isoliert. Kultivierte Zellen wurden bis zur Konfluenz wachsen gelassen, zweimal mit PBS gewaschen und mit Trizol-Reagenz aufgeschlossen und die RNA isoliert.

Die Gesamt-RNA-Isolierung erfolgte mit Trizol-Reagenz (Invitrogen). Dafür wurden die Proben nach 10minütiger Inkubation mit Trizol-Reagenz bei Raumtemperatur (RT) mit 200 µl Chloroform versetzt, 15 sec gevortext, und für weitere 2-3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde durch Zentrifugation (12.000 g, 10 min, 4°C) die wässrige von der organischen Phase getrennt. Der Überstand wurde abgenommen, mit 600 µl Isopropanol versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Die RNA wurde durch Zentrifugation (12000 g, 10 min, 4°C) gefällt und mit 70% Ethanol/DEPC-H<sub>2</sub>O gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 30-50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und anschließend wurde die RNA-

Konzentration bestimmt. Zur Beseitigung von Kontaminationen mit genomischer DNA wurde dann ein DNase-Verdau durchgeführt. Dafür wurden 15 µg RNA 2,5 h nach Angaben des Herstellers mit *DNase I* (Invitrogen) inkubiert. Nach dem DNase-Verdau wurde die RNA-Lösung mit Phenol-Chloroform (20:1) behandelt, 15 sec gevortext und anschließend durch Zentrifugation (12000g, 10 min, 4°C) die wässrige von der organischen Phase getrennt. Danach wurde die RNA mit 2,5 M Ammoniumacetat-Lösung und 100% Ethanol behandelt, zentrifugiert und gefällt (12000 g, 10 min, 4°C). Das RNA-Pellet wurde mit 75% Ethanol gewaschen, in DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Anschließend wurde die RNA-Konzentration bestimmt.

### ***cDNA-Synthese und quantitative PCR***

Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben. Dafür wurden 5 µg RNA mit Reverser Transkriptase (MMLV Reverse Transcriptase, Promega) in cDNA nach Angaben des Herstellers umgeschrieben. Für die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) wurde ein 20 µl Reaktionsansatz aus 0,5 µl cDNA, 0,5 µl 10 µM Primermix, 10 µl 2x SYBR-Green (Abgene) und 9,0 µl DEPC-H<sub>2</sub>O pipettiert. Die Primer wurden so gewählt, dass sie eine optimale Annealingtemperatur bei 60°C besaßen und die 150-250 bp langen DNA-Stücke mit folgendem PCR-Programm amplifiziert werden konnten; 95°C 15 min; 94°C 20 sec, 60°C 45 sec, 72°C 45 sec; 40 Zyklen). Die qPCR wurden jeweils mit drei unabhängig präparierten cDNAs durchgeführt, die Ergebnisse gemittelt und die Variabilität als Standardabweichung angegeben.

### ***Microarray-Analyse***

Mit der DNA-Microarray-Technologie wurde die Genexpression von mehr als 39.000 Transkripten mit einem einzelnen Array untersucht. Es wurden GeneChip<sup>®</sup> Mouse Genome 430 2.0 Microarrays von Affymetrix (Santa Clara, USA) verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden in einem ersten Versuch die Genexpressionen zwischen den Speicheldrüsen der vier verschiedenen Genotypen (Wildtyp,  $\Delta N$ - $\beta$ -Cat oder  $\Delta BmpR1a$  und  $\Delta N$ - $\beta$ -Cat; $\Delta BmpR1a$ ) am Tag P1 verglichen. In einem weiteren Versuch wurden die Genexpressionen in den

vorher durch FACS sortierten CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup> Zellen aus einfach-mutanten ( $\Delta$ N- $\beta$ -Cat oder  $\Delta$ BmpR1a) und doppelt-mutanten ( $\Delta$ N- $\beta$ -Cat; $\Delta$ BmpR1a) Mäusen am Tag P90 ermittelt. Mithilfe des Trizol-Reagenz wurde die RNA isoliert, wie unter Abschnitt RNA-Isolierung beschrieben. Die RNA-Qualität wurde durch Kapillarelektrophorese mit einem Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., Böblingen) getestet.

Die Gesamt-RNA wurde exakt nach den Vorgaben des GeneChip<sup>®</sup> 3' IVT Express Kit (Affymetrix, Santa Clara, USA) in zwei Schritten in eine doppelsträngige cDNA umgeschrieben und daraus eine Biotin-markierte antisense-cRNA synthetisiert. Danach wurde die cRNA aufgereinigt und durch eine metallische Hydrolyse auf eine durchschnittliche Länge von 35 bis 200 Nukleotide fragmentiert. Die fragmentierte cRNA wurde für die weiteren Schritte an die Microarray-Technologie-Plattform des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin, Berlin Buch übergeben. Dort wurde die fragmentierte cRNA auf den Gen-Chip hybridisiert und mit einem Streptavidin-phycoerythrin biotinylierten anti-Streptavidin-Antikörper behandelt. Nach dem Waschen wurden die Chips mit einem Laser gescannt und die Intensitäten der Interaktionen zwischen den Oligos auf dem Chip und der markierten cRNA mit der Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> Software berechnet (Rohdaten in CEL-Dateien).

Die Normalisierung und Auswertung der Rohdaten wurde mit der Genespring-Software (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) durchgeführt. Zur Korrektur des Hintergrunds und zur Normalisierung wurde die GCRMA-Methode (robuste Multiarray-Analyse: RMA) verwendet. Die GCRMA-Methode ist eine Version der RMA, die den GC-Gehalt der Proben berücksichtigt. Die weitere Normalisierung wurde entsprechend den Anleitungen und Vorgaben der Genespring-Software durchgeführt. In der Analyse wurden alle Gene mit mindestens 1,5-facher Expressionsveränderung herausgefiltert. Die Unterschiede in den Genexpressionen wurden mit t-Test auf Signifikanz überprüft und bestätigt, wobei die Expression ausgewählter Gene mit qPCR verifiziert wurde. Die in Tabelle 5 aufgeführten Oligonukleotide wurden dafür verwendet:

Tab. 5: Oligonukleotide für quantitative Echtzeit-PCR.

Gen	Orientierung	Oligonukleotid-Sequenz
mβ-actin	sense	5'-TCGTGCGTGACATCAAAGAGAAGC-3'
mβ-actin	antisense	5'-ATGGATGCCACAGGATTCCATACC-3'
mAbcb1b	sense	5'-TTATGCTGCTTGTTTCCGGTTCGG-3'
mAbcb1b	antisense	5'-TTTGGCTTTCGCATAGTCAGGAGC-3'
mAxin2	sense	5'-AACTGAAACTGGAGCTGGAAAGCC-3'
mAxin2	antisense	5'-TTTGTGGGTCCTCTTCATAGCTGC-3'
mBmp4	sense	5'-AGAAGAATAAGAACTGCCGTCGCC-3'
mBmp4	antisense	5'-ATGGCATGGTTGGTTGAGTTGAGG-3'
mCdgap	sense	5'-ATTGCCGGATTGGAAGAGAAAGCC-3'
mCdgap	antisense	5'-ACGGTTGCTAAGTTCCAGTTGTGG-3'
mCK6	sense	5'-AGAGAGGGGTCGCATGAACT-3'
mCK6	antisense	5'-TCATCTGTTAGACTGTCTGCCTT-3'
mc-myc	sense	5'-TCCTGAAGCAGATCAGCAACAACC-3'
mc-myc	antisense	5'-TGCTTGAATGGACAGGATGTAGGC-3'
mDkk1	sense	5'-TGTTGTGCAAGACACTTCTGGTCC-3'
mDkk1	antisense	5'-TGTGGAGCCTAGAAGAATTGCTGG-3'
mDnaja1	sense	5'-TACAGCTGGTTGAAGCATTGTGCG-3'
mDnaja1	antisense	5'-TCATATGGCCGACGGTATATTGGC-3'
mDnajc6	sense	5'-TCATTTGCCAGCAAACCTACCACC-3'
mDnajc6	antisense	5'-AAGCTCACGTTGTAATTGGGTCCG-3'
mDppa5	sense	5'-GAAATATCTGTTTGGCCACAGGG-3'
mDppa5	antisense	5'-GCCATGGACTGAAGCATCCATTTAGC-3'
mFas	sense	5'-AGTGCAAACCAGACTTCTACTGCG-3'
mFas	antisense	5'-AAGGATGGTCAACAACCATAGGCG-3'
mFgf5	sense	5'-TCCTTGCTCTTCCTCATCTTCTGC-3'
mFgf5	antisense	5'-ACTGGAACTGCTATGTTCCGAGC-3'
mGeminin	sense	5'-ATCTCAGACTTCAAGCTGTGGTCC-3'
mGeminin	antisense	5'-TTTATTCTCCTTTCTCAGGCGGGC-3'
mKlf3	sense	5'-GAA GCC CAA CAA ATA TGG GGT-3'
mKlf3	antisense	5'-GGA CGG GAA CTT CAG AGA GG-3'
mKlf5	sense	5'-ACGTCAATGAAACAGTTCCAGGGC-3'
mKlf5	antisense	5'-TTGGGTTGTGAATCGCCAGTTTGG-3'
mKlk1b3	sense	5'-ACCGATTTGTCAGCAAAGCCATCC-3'
mKlk1b3	antisense	5'-AATTTGGTGGGTGTAATGCTGCCC-3'
mLef-1	sense	5'-TGATGCCCAATATGAACAGCGACC-3'
mLef-1	antisense	5'-TTGCTTGGAGTTGACATCTGACGG-3'
mLoricrin	sense	5'-TTGTGGAAGACCTCTGGTGGAGG-3'
mLoricrin	antisense	5'-AACCACCTCCATAGGAACCAACCG-3'
mLrrc34	sense	5'-TCAAGGGAATAAACCTGAACCGGC-3'
mLrrc34	antisense	5'-ATTGCAGCTGACATCAAGGTAGCG-3'
mMsx2	sense	5'-AAATCTGGTTCCAGAACCGAAGGG-3'
mMsx2	antisense	5'-CATGGTAGATGCCATATCCAACCG-3'
mNr5a2	sense	5'-ACACAGAAGTCGCGTTCAACAACC-3'
mNr5a2	antisense	5'-TAGTTGCAAACCGTGATGTCAGC-3'
mPdpn	sense	5'-CACAGAGAACACGAGAGTACAACC-3'
mPdpn	antisense	5'-ACGCCAACTATGATTCCAACCAAG-3'
mTbx6	sense	5'-GGCAGCTCCATCTGTACCAT-3'
mTbx6	antisense	5'-ACCGAGGCTCAGTACATTGG-3'
mTrim2	sense	5'-TGGACAGTTCAAAAGTCGTTTCG-3'
mTrim2	antisense	5'-AATGCTAACCCACTTGTTGTCAT-3'

## ***Immunhistologische Methoden***

### **Vorbereitung von Paraffin-Schnitten**

Die Tiere wurden getötet, die Organe entnommen und in Formalin (3,5% Formaldehyd in PBS) über üN bei 4°C fixiert. Die Proben wurden am nächsten Tag mit 70% Ethanol gewaschen und die weiteren Inkubationen mit Hilfe des Dehydrierungs-Automaten „Excelsior“ (Thermolife Sciences) durchgeführt. In einer Ethanol-Reihe wurden die Proben dehydriert: 70%, 80%, 95%, und 100% Ethanol. Nach der Dehydrierung wurden die Proben 2x1 h in 100% Xylol inkubiert und anschließend 60 min und danach 45 min in 60°C Paraffin (Roti-Plast, Roth, Karlsruhe) inkubiert. Die Proben wurden anschließend mit Hilfe einer Paraffin-Ausgießstation bei RT in Plastik-Kassetten mit 60°C warmen Paraffin eingebettet und die festen Paraffin-Blöcke wurden zum Schneiden verwendet. Mit einem Mikrotom (Microm HM400R) wurden 5-8 µm dünne Paraffinschnitte angefertigt und in ein 55°C warmes Wasserbad überführt, von welchem die Schnitte auf Glasobjektträger aufgezogen wurden (Menzel, Braunschweig). Die Paraffinschnitte wurden danach entweder mit Hämatoxylin-Eosin (H&E) gefärbt oder für Immunodetektionen (Immunohistochemie und Immunfluoreszenz) sowie *In-situ*-Hybridisierungen verwendet.

### **Herstellung von Gefrierschnitten**

Die Organe wurden entnommen, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und in flüssigen Stickstoff schockgefroren sowie anschließend bei -80°C gelagert. Die Proben wurden in „TissueTek“ (OCT-Compound; Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und 8-12 µm dünne Schnitte mit Hilfe eines Kryostaten (Microm HM560, Walldorf) hergestellt und auf Glasobjektträger (Menzel, Braunschweig) aufgezogen. Die Objektträger mit den Schnitten wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

### **Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung auf Paraffinschnitten**

Die getrockneten Paraffinschnitte wurden für 90 min in einem Inkubator bei 60°C erwärmt und die Objekte danach 3x5 min in Xylol vom Paraffin befreit. Nach

Rehydrierung in einer absteigenden Ethanolreihe (je 3 min: 2x 100% Ethanol, 96% Ethanol, 80% Ethanol, 70% Ethanol) wurden die Schnitte 1 min in Hämatoxylin (Zubereitung nach Romeis & Boeck [301]) gefärbt, sofort in rinnendes handwarmes Leitungswasser überführt (10 min) und danach 5 min in 0,1%-ethanolischem Eosin [1 g/l Eosin Y (Merck) in 70% Ethanol mit 0,1 M Essigsäure] gefärbt. Durch die Dehydrierung in einer ansteigenden Ethanolreihe und 2x5 min in Xylol wurden die Proben auf den anschließenden Einschluss mit Entellan (Merck, Darmstadt) vorbereitet.

### **Immunofärbungen**

Die Gewebeschnitte wurden mit Xylol entwachst und mit einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 90%, 80%, 70% Ethanol) rehydriert. Danach erfolgte eine Antigen-Demaskierung durch Kochen in Natriumcitrat-Puffer ( $\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_7\text{Na}$ , 10  $\mu\text{M}$ , pH 6,0). Unspezifische Antikörper (AK)-Bindungen wurden durch 60minütige Inkubation bei RT mit 5% inaktivierten Pferdeserum (PS) und 0,1% Tween/PBS (5% PS/PBST) blockiert. Danach wurden die Gewebeschnitte mit dem in 5% PS/PBST verdünnten Primär-AK entweder bei 4°C üN oder 60-120 min bei RT inkubiert. Die Gewebeschnitte wurden zur Entfernung von ungebundenen Primär-AK 3x10 min mit PBST gewaschen. Danach wurden die Schnitte mit Cy2 oder Cy3-konjugierten Sekundär-AK (verdünnt in 5% PS/PBST) sowie mit den DNA-spezifischen Farbstoffen DAPI oder Yopro (Molecular Probes) für 60 min bei RT inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend 3x20 min mit PBST gewaschen und schließlich mit "Immu-Mount" (Shandon, Frankfurt) eingeschlossen.

### ***In-situ*-Hybridisierung**

*In-situ*-Hybridisierungen auf Paraffinschnitten wurden mit Digoxigenin (DIG)-markierten Sonden (Roche) entsprechend den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden anti-sense Transkripte von muriner cDNA für Keratin 14 (GenBank Accession Nummer: BC003325, aus Pubmed) verwendet. Für *In-situ*-Hybridisierungen auf Gewebeschnitten (SuperFrost Plus, Menzel-Glaeser) wurden diese mit Xylol entwachst und in einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 95%, 85%, 70%, 50%, 25% Ethanol) und PBS rehydriert. Die weitere Prozedur wurde bei RT durchgeführt. Die Proben wurden mit 4% Formaldehyd für 15 min



erneut fixiert, mit 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBS für 15 min geblichen und 3x5 min mit PBS gewaschen. Die Gewebeschnitte wurden danach mit 10 µg/ml Proteinase K/PBS für 10 min behandelt und mit 0,2% Glycin/PBS für 2 min gewaschen. Die Proben wurden erneut mit 4% Formaldehyd für 10 min fixiert und 2x5 min mit PBS gewaschen. Dann erfolgte eine Inkubation in 100 mM Tris-HCl (pH 7,5) für 2 min, in 100 mM Tris-Acetat (100 mM Tris-HCl mit 0,25% Essigsäureanhydrid; pH 7,5) für 10 min, in 2x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Na<sub>3</sub>-Citrat) 2x5 min und eine Dehydrierung für je 2 min mit 30%, 50%, 75%, 85%, 95% und 100% Ethanol. Die luftgetrockneten Proben wurden üN bei 63°C in einer feuchten Kammer (5x SSC) mit Hybridisierungslösung [50% Formamid, 5% Boehringer Blocking Reagent (Roche), 5x SSC; pH 5,0, 10% Dextransulfat (Sigma), 5 mM EDTA (Merck), 0,1% Tween, 100 µg/ml Heparin, 100 µg/ml tRNA, 100 µg/ml ssDNA, 1 µg/ml DIG-markierte RNA Sonde] inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben wie folgt gewaschen: 2x15 min mit Lösung I (50% Formamid, 5x SSC, pH 4,5; 0,1% Tween) bei 60°C, 3x30 min mit Lösung II (50% Formamid, 2x SSC, pH 4,5; 0,1% Tween) bei 60°C und 3x5 min mit TBST (150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl; pH 7,5, 2 mM KCl, 0,1% Triton-X100) bei RT. Die Proben wurden in 10% Schafserum (GIBCO) und 1% Boehringer Blocking Reagent (Roche) in TBST bei RT für 120 min bei 4°C blockiert. Danach wurden die Gewebeschnitte mit anti-Dig Fab (Roche)-alkalischer Phosphatase-gekoppelten (1:1.000) AK bei 4°C üN inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Proben bei RT 6x15 min mit TBST und 2x10 min mit NTMT (100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Tween) gewaschen, woran sich eine 10minütige Inkubation in 1 mM Levamisol in NTMT anschloss. Der Nachweis der alkalischen Phosphatase erfolgte mit BM Purple AP-Substrat (Roche) bei RT oder üN bei 37°C in einer feuchten Kammer (H<sub>2</sub>O). Die Schnitte wurden schließlich dehydriert und mit Entellan-Einbettmedium (Merck) eingeschlossen.

### **Beta-Galactosidase-Färbung**

Die 8-12 µm dünnen Gefrierschnitte wurden für 30 min bei 4°C gelagert, mit 0,2 % Glutaraldehyd/PBS bei RT für 10 min fixiert und danach 3x15 min mit LacZ-Waschpuffer [2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% Natriumdeoxycholat, 0,02 % Nonidet-P40 (NP-40), in PBS, pH 7,3] inkubiert. Die Färbung erfolgte in 0,5 mg/ml X-gal, 5 mM Kaliumhexacyanoferrat und 5 mM Kaliumferricyanid in LacZ-Waschpuffer bei

mäßigem Schütteln und lichtgeschützt bei RT oder 37°C. Nach Beendigung der Färbung wurden die Objektträger mit PBS gewaschen, mit einer ansteigenden Ethanolreihe dehydriert und mit Entellan-Einbettmedium (Merck) eingeschlossen.

## **Elektronenmikroskopie**

Die Zellen wurden in Formalin (3,5% Formaldehyd in PBS) fixiert, mit 1% OsO<sub>4</sub> für 45 min inkubiert und mit Gallusgerbsäure sowie Uranylacetat/Methanol-Lösung kontrastiert. Danach wurden die Proben in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und in PolyBed (Polysciences Europe GmbH) eingebettet. Nach Polymerisation der Blöcke wurden Ultradünnschnitte (60-80 nm) angefertigt und mit Bleicitrat (50 ml H<sub>2</sub>O: 1,33 g PbNO<sub>3</sub>, 1,76 g Na-Citrat x 2H<sub>2</sub>O, 30 ml heißes H<sub>2</sub>O, 8 ml 1 M NaOH) kontrastiert. Danach erfolgten Aufnahmen und Auswertung mit einem Elektronenmikroskop (LEO 906E TEM, Zeiss SMT, Morada Kamera SIS). Die Elektronenmikroskopie-Versuche wurden in Kooperation mit Dr. Volker Brinkmann vom Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in Berlin durchgeführt.

## **Biochemische Methoden**

### **Histon-Extraktion aus Säugerzellen**

80-90% konfluente Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und danach in Triton-Extraktions-Puffer (TEB; PBS mit 0,5% Triton-X100, 2 mM Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid, 0,02% NaN<sub>3</sub>) resuspendiert (10<sup>7</sup> Zellen/ml). Die Zellen wurden 10 min auf Eis lysiert und danach bei 2000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit TEB-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet mit 0,2 M HCL resuspendiert und die Histone wurden für ca. 16 h bei 4°C extrahiert. Danach wurden die Proben zentrifugiert und vom Überstand, der die Histone enthält, wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Die Proben wurden sofort weiter prozessiert oder bei -20°C gelagert.

Zur Histonextraktion aus murinen Speicheldrüsengewebe wurden die Speicheldrüsen zunächst mit TEB-Puffer versetzt und anschließend auf Eis mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Die Proben wurden anschließend weiter prozessiert wie oben beschrieben.

### **SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse**

Zunächst wurde die Proteinmenge mit der DC-Methode (detergent compatible) von BIORAD bestimmt. Gleiche Proteinmengen wurden mithilfe der SDS-PAGE (10% Trenngel: 10% Acrylamid; 0,32% N,N'-Methylenbisacrylamid; 375 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED; Sammelgel: 4% Acrylamid; 0,1% N,N'-Methylenbisacrylamid; 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED) in Elektrophoresepuffer (25 mM Tris; 20 mM Glycin; 2% SDS) aufgetrennt. Die mit 2x Probenpuffer (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% Glycerin; 0,01% Bromphenolblau; 2%  $\beta$ -Mercaptoethanol) versetzten Proben wurden zusammen mit dem Proteinmarker (Prestained Protein Marker, NEB) vor dem Auftragen zum Denaturieren für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in der Regel bei 130 V für mehrere Stunden oder  $\infty$  bei 10 mA. Die Proteine wurden anschließend mit einem Nass-Transfer  $\infty$  (4°C; 30 V) auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid, Immobilon-P, 45 $\mu$ m, Millipore) übertragen. Dazu wurde die Membran kurz in Methanol inkubiert und zusammen mit dem in Transferpuffer (200 mM Glycin; 25 mM Tris; 20% Methanol) getränkten Proteingel und je drei Lagen Whatman-Papier luftblasenfrei aufeinander gelegt und in die Transferzelle eingespannt. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mindestens 30 min in Milchpuffer (4% Magermilch-Pulver, 0,5% Tween20 in TBS) geschüttelt und anschließend für 1-2 h mit dem Primär-AK in Milchpuffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3x5 min in TBS-T (25 mM Tris pH 7,4; 137 mM NaCl; 5 mM KCl; 0,7 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5% Tween20) gewaschen und danach 45 min mit dem Sekundär-AK in Milchpuffer inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBS-T wurde die Membran einmal in TBS gewaschen. Dann wurde die Membran 1 min mit einer Mischung der beiden ECL-Lösungen (je 2 ml/dm<sup>2</sup> Membranfläche, Millipore WBKLS05000) überschichtet. Durch diese Überschichtung können die vom Primär-AK erkannten Proteine mittels des Dokumentationssystems INFINITY-3000 (Vilber Lourmat, Eberhardzell)

visualisiert und durch die INFINITY-Capt Steuerungssoftware (Vilber Lourmat, Eberhardzell) analysiert werden.

## ***Zellbiologische Methoden***

### **Kultivierung von Zellen**

Die Primärzellen aus Speicheldrüsendgewebe wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Die Zellen wurden in DMEM/F12-Medium kultiviert, das folgende Zusätze enthielt: 20% KSR (Knockout Serum Replacement), nichtessentielle minimale Aminosäuren, Penicillin/Streptomycin, L-Glutamin und  $\beta$ -Mercaptoethanol (alles Invitrogen).

### **Bestimmung der Zellproliferation**

Die Zellproliferationsrate wurde mit dem „WST-1 cell proliferation assay“ (Roche) exakt nach den Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurden 10<sup>4</sup> bis 10<sup>5</sup> Zellen/Well in 96-Well-Platten kultiviert und zu den entsprechenden Zeitpunkten mit WST-1-Lösung für 3 h bei 37°C im Zellkulturinkubator behandelt. Anschließend wurden die Zellen für 5 min leicht geschwenkt und danach die Absorption der Zellen/Well bei 450 nm mit einem Mikroplatten-Photometer bestimmt. Die Absorption korreliert positiv mit der Anzahl der lebenden Zellen/Well.

### **Nicht-adhärenzte Kultivierung von Salisphären**

Die Zellen wurden in einer dreidimensionalen Matrix aus Matrigel (Invitrogen) kultiviert. Dafür wurde in 24-Well-Platten zunächst eine Bodenschicht aus 0,6% Agarose/Medium vorgelegt. Nach Polymerisation der Agarose bei 4°C wurde die Matrigellösung mit den Zellen auf die Bodenschicht aufgetragen und die Zellen bei 37°C im Zellkulturinkubator kultiviert. Nach 4 h wurden die Zellen mit Medium und HGF (100 U/ml) inkubiert. Rekombinantes HGF wurde von Brinkmann et al. hergestellt [269]. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit ICG-

001 [267], Valproinsäure (Enzo Life Sciences) oder 5-Azazytidin (Sigma-Aldrich) behandelt.

### **Präparation von Zellen für FACS-Analyse und Zytozentrifugation**

Die Speicheldrüsen und Tumoren der Mäuse wurden in einer 6 cm-Zellkulturschale mit Gewebeaufschluss-Puffer inkubiert [DMEM/F12-Medium (Invitrogen), 1,67 mg/ml Collagenase (Invitrogen), 1,33 mg/ml Hyaluronidase (Sigma)] und mit Skalpell zerkleinert. Dann wurde der Gewebeverdau in Gewebeaufschluss-Puffer für 90 min bei 37°C bei mäßigem Schütteln durchgeführt. Das unvollständig aufgeschlossene Gewebe wurde bei RT und 1.000 g für 5 min zentrifugiert und das Gewebepellet für 60 min bei 37°C mit Dispersionspuffer [DMEM/F12-Medium mit 1,67 mg/ml Dispase (Invitrogen)] behandelt. Die Zellsuspension wurde gefiltert [70 µm Falcon-Filteraufsatz (BD Biosciences)] und zentrifugiert. Dann wurde die Zellsuspension zweimal mit DMEM/F12-Medium und zweimal mit 10% FBS/PBS gewaschen (FBS von Invitrogen). Nach Lyse der roten Blutzellen mit eiskaltem 0,8% NH<sub>4</sub>Cl/PBS wurden die Zellen mit Färbepuffer (1% FBS/PBS) gewaschen und 20 min mit anti-mouse CD16/CD32 (anti-mouse Fc-Rezeptor)-Antikörper behandelt (BD Pharmingen)]. Die Zellen wurden danach 3x1 min mit Färbepuffer gewaschen und 60 min bei 4°C in Dunkelheit mit folgenden primären Oberflächen-AK inkubiert: Phycoerythrin (PE)-konjugiert Ratte-anti CD24 (BD Pharmingen), biotinyliert Ziege-anti CD29 (R&D Systems), Allophycocyanin (APC)-konjugiert CD29 (R&D Systems), Maus-anti SSEA-1 (R&D Systems). Die Zellen wurden anschließend 3x1 min mit Färbepuffer gewaschen und 45 min bei Dunkelheit und 4°C mit folgenden Sekundär-AK behandelt: Streptavidin-APC (Invitrogen) oder Cy5 (BD Pharmingen). Die Zellen wurden danach 3x1 min mit kaltem PBS gewaschen und gefiltert [40 µm Falcon-Filteraufsatz (BD Biosciences)]. Die FACS-Analyse erfolgte in der FACS-Service-Einheit des Max-Delbrück-Centrums mit den Geräten FACS-ARIA und FACS Caliber (beide BD Biosciences). Die Daten wurden mit dem Programm CELLQuest (BD Biosciences) ausgewertet. Apoptotische Zellen wurden als Dapi-positive Zellen detektiert und in der Analyse ausgeschlossen. Die FACS-Analyse wurde so durchgeführt, dass 99,9% aller

Zellen ausgeschlossen wurden, die sich mit Fluorochromen-gekoppelten Isoform-Kontroll-AK anfärben ließen.

Zur Herstellung von Zytozentrifugen-Präparaten wurden 50.000 Zellen in 200 µl Zellsuspension durch 10minütige Zentrifugation bei 800 rpm und RT in einer Zytozentrifuge (Shandon Elliot Cytospin, Shandon, Frankfurt/M) auf einen Objektträger aufgebracht. Anschließend wurden die Zellen 30 min mit Formalin (3,5% Formaldehyd in PBS) fixiert und bis zur Färbung bei 4°C in PBS für maximal 24 h aufbewahrt.

## **Versuchstiere**

### **Regenerations-Experiment**

Männliche, 35 Tage alte Mäuse (3 Mäuse/Gruppe) wurden durch intraperitoneale Injektion von Ketamin (Bela-Pharma, Vechta)/Xylazin (Bayer, Leverkusen) in Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9%, B. Braun, Meldungen) narkotisiert. Die Tiere wurden auf dem Rücken liegend auf einer Wärmeplatte bei 37°C positioniert und mit Augensalbe (Polyspectran, Alcon Pharma, Freiburg) versorgt, um das Austrocknen der Augen zu verhindern. Nach vollständigem Eintritt der Narkose erfolgte eine ca. 1 cm lange Inzision entlang der Mittellinie am Hals in Höhe des Kehlkopfes, wobei die Speicheldrüsen exponiert wurden. Die Hauptspeicheldrüsendgänge wurden durch Surgicryl®-Nahtmaterial USP4/0 (SMI, St.Vith, Belgien) mit einer Ligatur versehen und die Wunde mit Surgicryl®-Nahtmaterial USP4/0 vernäht. Nach einer Beobachtungszeit von 5 Tagen wurden die Mäuse getötet (P40), die Speicheldrüsen entnommen und analysiert. Die Versuche wurden methodisch in Anlehnung an Hisatomi *et al.*, 2004 durchgeführt [257].

### **Transplantation von Tumorzellen in NOD/SCID-Mäuse**

Sowohl unsortierte als auch mit FACS isolierte CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Zellen aus Speicheldrüsen doppelt-mutanter Mäuse (K14-Cre; $\Delta$ N- $\beta$ -Cat; $\Delta$ BmpR1a) wurden in PBS resuspendiert und in abnehmenden Zellzahlen in einem Volumen von 100  $\mu$ l subkutan in die Rückenhaut von NOD/SCID-Mäusen (Charles River, Sulzbach) injiziert (3 Mäuse/Gruppe). Die Tumorgroße wurde durch Messen der Breite und Länge des Tumors zweimal in der Woche bestimmt. Nach 3 Wochen wurden die Tiere getötet und analysiert. Die Transplantations-Versuche wurden in Kooperation mit Dr. Klaus Eckert vom Max-Delbrück-Centrum Berlin und der Epo GmbH Berlin durchgeführt.

### ***Humane Tumorproben***

In Zusammenarbeit mit Prof. Christoph Loddenkemper, einem erfahrenen Pathologen der Charité Universitätsmedizin Berlin, wurden primäre Plattenepithel-Karzinome der Speicheldrüse von 13 Patienten aus der Tumorprobenbank der Charité - Universitätsmedizin Berlin Campus Benjamin Franklin untersucht (Tab. 6).

**Tab. 6: Charakteristika humaner Plattenepithel-Karzinome der Speicheldrüse.\***

Patient #	Alter (y)	Geschlecht	Tumor-Lokalisation	Tumor-Grad
1	32	M	<i>Glandula parotidea</i>	3
2	55	M	<i>Glandula parotidea</i>	2
3	64	F	<i>Glandula parotidea</i>	3
4	71	F	<i>Glandula parotidea</i>	2
5	74	F	<i>Glandula parotidea</i>	3
6	76	M	<i>Glandula parotidea</i>	3
7	76	F	<i>Glandula parotidea</i>	3
8	76	F	<i>Glandula parotidea</i>	3
9	76	M	<i>Glandula parotidea</i>	3
10	79	F	<i>Glandula sublingualis</i>	3
11	80	M	<i>Glandula parotidea</i>	3
12	83	F	<i>Glandula parotidea</i>	2
13	94	F	<i>Glandula parotidea</i>	2

Ø 72,0

Ø W 77,1

Ø M 63,8

\*Tumoren mit möglichem metastatischen Ursprung oder Dysplasien der oralen Mukosa wurden von der Analyse ausgeschlossen. Tumorklassifikation und Tumordifferenzierung (Tumor-Grad) wurden entsprechend den geltenden klinischen und pathologischen Richtlinien bestimmt. y, Jahr; Ø, Mittelwert; M, männlich; W, weiblich.



## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent (Vol/Vol)
°C	Grad Celsius
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Aza	5-Azazytidin
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumine / Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CK	Cytokeratin
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol-Hydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 / Zellkulturmedium mit Nährstoffmischung F12
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonaler Tag
ECL	Enhanced Chemiluminescence / verbesserte Chemolumineszenz
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
FACS	fluorescence activated cell sorting / Fluoreszenz-markierte Zellsortierung
FBS	fetal bovine serum / fötales Rinderserum
h	Stunde(n)
H&E	Hämatoxylin-Eosin-Lösung
HDAC	Histone deacetylase / Histon-Deazetylase
HGF	hepatocyte growth factor / Hepatozyten-Wachstumsfaktor
ICG-001	Niedermolekularer Inhibitor der $\beta$ -Catenin-CBP-Interaktion
iPS	Induced pluripotent stem cells / Induktion pluripotenter Stammzellen
M	mol/l
MDC	Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin Buch
min	Minute(n)
ml	Milliliter

mM	Millimolar
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus/Moloney Maus-Leukämie-Virus
ng	Nanogramm
NOD-SCID	Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency mouse model/ nicht-adipös-diabetisch/ schwerer kombinierter Immundefekt-Mausmodell
P	Postnataler Tag
PBS	phosphate buffered saline / phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBS-T	phosphate buffered saline with Tween20 / phosphat-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20
PCR	polymerase chain reaction / Polymerase-Kettenreaktion
pH	potentium hydrogenii
pHH3	Phospho-Histon H3
PS	Pferdeserum
Pubmed	englischsprachige textbasierte Meta-Datenbank der nationalen medizinischen Bibliothek der USA
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulphate / Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gelelectrophoresis / Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SSC	standard saline citrate / Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
ssDNA	single strand DNA/einzelsträngige DNA
TBS	tris buffered saline / Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBS-T	tris buffered saline with Tween20 / Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20
TEB	Triton-Extraktions-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TNB	Tris-Natrium-Puffer
tRNA	Transfer-RNA
ün	über Nacht
VPA	Valproinsäure
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl $\beta$ -D-Galaktosid
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )

## Literaturverzeichnis

- [1] Morrison, S. J. and Kimble, J. (2006): Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer, *Nature* 441 [7097], pp. 1068-74. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16810241](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16810241)
- [2] Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006): Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell* 126 [4], pp. 663-76. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16904174](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16904174)
- [3] Meissner, A.; Wernig, M. and Jaenisch, R. (2007): Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells, *Nat Biotechnol* 25 [10], pp. 1177-81. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17724450](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17724450)
- [4] Koller, P. C. and Doak, S. M. (1960): Serial transfer of donor marrow in radiation mouse chimaeras, *Int J Radiat Biol* 2, pp. 1-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14410732](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14410732)
- [5] Vos, O.; Davids, J. A.; Weyzen, W. W. and Van Bekkum, D. W. (1956): Evidence for the cellular hypothesis in radiation protection by bone marrow cells, *Acta Physiol Pharmacol Neerl* 4 [4], pp. 482-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=13313162](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13313162)
- [6] Thomas, E. D. and Epstein, R. B. (1965): Bone marrow transplantation in acute leukemia, *Cancer Res* 25 [9], pp. 1521-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=4955705](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4955705)
- [7] Wilson, A. and Trumpp, A. (2006): Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches, *Nat Rev Immunol* 6 [2], pp. 93-106. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16491134](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16491134)
- [8] Fodde, R. and Brabletz, T. (2007): Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior, *Curr Opin Cell Biol*. 19 [2], pp. 150-158. URL: PM:17306971
- [9] Sneddon, J. B. and Werb, Z. (2007): Location, location, location: the cancer stem cell niche, *Cell Stem Cell* 1 [6], pp. 607-611. URL: PM:18371402
- [10] Lapidot, T.; Sirard, C.; Vormoor, J.; Murdoch, B.; Hoang, T.; Caceres-Cortes, J.; Minden, M.; Paterson, B.; Caligiuri, M. A. and Dick, J. E. (1994): A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice, *Nature* 367 [6464], pp. 645-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7509044](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7509044)
- [11] Al-Hajj, M.; Wicha, M. S.; Benito-Hernandez, A.; Morrison, S. J. and Clarke, M. F. (2003): Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 [7], pp. 3983-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12629218](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12629218)
- [12] Singh, S. K.; Hawkins, C.; Clarke, I. D.; Squire, J. A.; Bayani, J.; Hide, T.; Henkelman, R. M.; Cusimano, M. D. and Dirks, P. B. (2004): Identification of

- human brain tumour initiating cells, *Nature* 432 [7015], pp. 396-401. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15549107](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15549107)
- [13] Ricci-Vitiani, L.; Lombardi, D. G.; Pilozzi, E.; Biffoni, M.; Todaro, M.; Peschle, C. and De Maria, R. (2007): Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells, *Nature* 445 [7123], pp. 111-5. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17122771](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17122771)
- [14] Malanchi, I.; Peinado, H.; Kassen, D.; Hussenet, T.; Metzger, D.; Chambon, P.; Huber, M.; Hohl, D.; Cano, A.; Birchmeier, W. and Huelsken, J. (2008): Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling, *Nature* 452 [7187], pp. 650-3. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18385740](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18385740)
- [15] Ben-Porath, I.; Thomson, M. W.; Carey, V. J.; Ge, R.; Bell, G. W.; Regev, A. and Weinberg, R. A. (2008): An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors, *Nat Genet* 40 [5], pp. 499-507. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18443585](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18443585)
- [16] Feinberg, A. P.; Ohlsson, R. and Henikoff, S. (2006): The epigenetic progenitor origin of human cancer, *Nat Rev Genet* 7 [1], pp. 21-33. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16369569](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16369569)
- [17] Wu, H. and Sun, Y. E. (2006): Epigenetic regulation of stem cell differentiation, *Pediatr Res* 59 [4 Pt 2], pp. 21R-5R. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16549544](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16549544)
- [18] Klonisch, T.; Wiechec, E.; Hombach-Klonisch, S.; Ande, S. R.; Wesselborg, S.; Schulze-Osthoff, K. and Los, M. (2008): Cancer stem cell markers in common cancers - therapeutic implications, *Trends Mol Med* 14 [10], pp. 450-60. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18775674](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18775674)
- [19] Visvader, J. E. and Lindeman, G. J. (2008): Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions, *Nat Rev Cancer* 8 [10], pp. 755-68. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18784658](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18784658)
- [20] Barker, N.; Ridgway, R. A.; van Es, J. H.; van de Wetering, M.; Begthel, H.; van den Born, M.; Danenberg, E.; Clarke, A. R.; Sansom, O. J. and Clevers, H. (2009): Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer, *Nature* 457 [7229], pp. 608-11. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19092804](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19092804)
- [21] Read, T. A.; Fogarty, M. P.; Markant, S. L.; McLendon, R. E.; Wei, Z.; Ellison, D. W.; Febbo, P. G. and Wechsler-Reya, R. J. (2009): Identification of CD15 as a marker for tumor-propagating cells in a mouse model of medulloblastoma, *Cancer Cell* 15 [2], pp. 135-47. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19185848](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19185848)

- [22] Bloushtain-Qimron, N.; Yao, J.; Shipitsin, M.; Maruyama, R. and Polyak, K. (2009): Epigenetic patterns of embryonic and adult stem cells, *Cell Cycle* 8 [6], pp. 809-17. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19229128](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19229128)
- [23] Bibikova, M.; Laurent, L. C.; Ren, B.; Loring, J. F. and Fan, J. B. (2008): Unraveling epigenetic regulation in embryonic stem cells, *Cell Stem Cell* 2 [2], pp. 123-34. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18371433](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18371433)
- [24] Goldberg, A. D.; Allis, C. D. and Bernstein, E. (2007): Epigenetics: a landscape takes shape, *Cell* 128 [4], pp. 635-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17320500](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17320500)
- [25] Reik, W. (2007): Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development, *Nature* 447 [7143], pp. 425-32. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17522676](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17522676)
- [26] Ruthenburg, A. J.; Allis, C. D. and Wysocka, J. (2007): Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark, *Mol Cell* 25 [1], pp. 15-30. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17218268](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17218268)
- [27] Dreesen, O. and Brivanlou, A. H. (2007): Signaling pathways in cancer and embryonic stem cells, *Stem Cell Rev* 3 [1], pp. 7-17. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17873377](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17873377)
- [28] Nusse, R. and Varmus, H. E. (1982): Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome, *Cell* 31 [1], pp. 99-109. URL: PM:6297757
- [29] Sharma, R.P. (1973): Wingless, a new mutant in *D. melanogaster*, *Dros Inf Service*. 50 [134].
- [30] Cabrera, C. V.; Alonso, M. C.; Johnston, P.; Phillips, R. G. and Lawrence, P. A. (1987): Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene, *Cell* 50 [4], pp. 659-663. URL: PM:2440586
- [31] Rijsewijk, F.; Schuermann, M.; Wagenaar, E.; Parren, P.; Weigel, D. and Nusse, R. (1987): The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*, *Cell* 50 [4], pp. 649-657. URL: PM:3111720
- [32] Nusse, R.; Brown, A.; Papkoff, J.; Scambler, P.; Shackleford, G.; McMahon, A.; Moon, R. and Varmus, H. (1991): A new nomenclature for *int-1* and related genes: the Wnt gene family, *Cell* 64 [2], p. 231. URL: PM:1846319
- [33] Nüsslein-Volhard, C. and Wieschaus, E. (1980): Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*, *Nature* 287 [5785], pp. 795-801. URL: PM:6776413
- [34] Nüsslein-Volhard, C.; Wieschaus, E. and Kluding, H. (1984): Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. I. Zygotic loci on the second chromosome, *Roux's Archives of Developmental Biology* 193, pp. 267-282.
- [35] Perrimon, N. and Mahowald, A. P. (1987): Multiple functions of segment polarity genes in *Drosophila*, *Dev. Biol.* 119 [2], pp. 587-600. URL: PM:3803719

- [36] Perrimon, N.; Engstrom, L. and Mahowald, A. P. (1989): Zygotic lethals with specific maternal effect phenotypes in *Drosophila melanogaster*. I. Loci on the X chromosome, *Genetics* 121 [2], pp. 333-352. URL: PM:2499512
- [37] Cadigan, K. M. and Nusse, R. (1997): Wnt signaling: a common theme in animal development, *Genes Dev* 11 [24], pp. 3286-305. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9407023](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9407023)
- [38] Kadowaki, T.; Wilder, E.; Klingensmith, J.; Zachary, K. and Perrimon, N. (1996): The segment polarity gene *porcupine* encodes a putative multitransmembrane protein involved in Wingless processing, *Genes Dev* 10 [24], pp. 3116-28. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8985181](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8985181)
- [39] Tanaka, K.; Kitagawa, Y. and Kadowaki, T. (2002): *Drosophila* segment polarity gene product *porcupine* stimulates the posttranslational N-glycosylation of wingless in the endoplasmic reticulum, *J Biol Chem* 277 [15], pp. 12816-23. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11821428](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11821428)
- [40] Banziger, C.; Soldini, D.; Schutt, C.; Zipperlen, P.; Hausmann, G. and Basler, K. (2006): Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells, *Cell* 125 [3], pp. 509-22. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16678095](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16678095)
- [41] Bartscherer, K.; Pelte, N.; Ingelfinger, D. and Boutros, M. (2006): Secretion of Wnt ligands requires Evi, a conserved transmembrane protein, *Cell* 125 [3], pp. 523-33. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16678096](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16678096)
- [42] Coudreuse, D. Y.; Roel, G.; Betist, M. C.; Destree, O. and Korswagen, H. C. (2006): Wnt gradient formation requires retromer function in Wnt-producing cells, *Science* 312 [5775], pp. 921-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16645052](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16645052)
- [43] Goodman, R. M.; Thombre, S.; Firtina, Z.; Gray, D.; Betts, D.; Roebuck, J.; Spana, E. P. and Selva, E. M. (2006): Sprinter: a novel transmembrane protein required for Wg secretion and signaling, *Development* 133 [24], pp. 4901-11. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17108000](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17108000)
- [44] Mikels, A. J. and Nusse, R. (2006): Wnts as ligands: processing, secretion and reception, *Oncogene* 25 [57], pp. 7461-7468. URL: PM:17143290
- [45] Prasad, B. C. and Clark, S. G. (2006): Wnt signaling establishes anteroposterior neuronal polarity and requires retromer in *C. elegans*, *Development* 133 [9], pp. 1757-66. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16571624](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16571624)
- [46] Hausmann, G.; Banziger, C. and Basler, K. (2007): Helping Wingless take flight: how WNT proteins are secreted, *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 [4], pp. 331-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17342185](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17342185)



- [47] Eaton, S. (2008): Retromer retrieves wntless, *Dev Cell* 14 [1], pp. 4-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18194646](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18194646)
- [48] Bhanot, P.; Brink, M.; Samos, C. H.; Hsieh, J. C.; Wang, Y.; Macke, J. P.; Andrew, D.; Nathans, J. and Nusse, R. (1996): A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor, *Nature* 382 [6588], pp. 225-30. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8717036](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8717036)
- [49] Gomperts, S. N. (1996): Clustering membrane proteins: It's all coming together with the PSD-95/SAP90 protein family, *Cell* 84 [5], pp. 659-62. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8625403](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8625403)
- [50] Wang, Y.; Macke, J. P.; Abella, B. S.; Andreasson, K.; Worley, P.; Gilbert, D. J.; Copeland, N. G.; Jenkins, N. A. and Nathans, J. (1996): A large family of putative transmembrane receptors homologous to the product of the *Drosophila* tissue polarity gene frizzled, *J Biol Chem* 271 [8], pp. 4468-76. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8626800](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8626800)
- [51] Veeman, M. T.; Axelrod, J. D. and Moon, R. T. (2003): A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling, *Dev. Cell* 5 [3], pp. 367-377. URL: PM:12967557
- [52] Seifert, J. R. and Mlodzik, M. (2007): Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility, *Nat.Rev.Genet.* 8 [2], pp. 126-138. URL: PM:17230199
- [53] Riggelman, B.; Schedl, P. and Wieschaus, E. (1990): Spatial expression of the *Drosophila* segment polarity gene armadillo is posttranscriptionally regulated by wingless, *Cell* 63 [3], pp. 549-60. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2225066](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2225066)
- [54] Kemler, R. (1993): From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion, *Trends Genet.* 9 [9], pp. 317-321. URL: PM:8236461
- [55] Oda, H.; Uemura, T.; Shiomi, K.; Nagafuchi, A.; Tsukita, S. and Takeichi, M. (1993): Identification of a *Drosophila* homologue of alpha-catenin and its association with the armadillo protein, *J Cell Biol* 121 [5], pp. 1133-40. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8501118](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8501118)
- [56] Hulsken, J.; Birchmeier, W. and Behrens, J. (1994): E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton, *J. Cell Biol.* 127 [6 Pt 2], pp. 2061-2069. URL: PM:7806582
- [57] Behrens, J.; von Kries, J. P.; Kuhl, M.; Bruhn, L.; Wedlich, D.; Grosschedl, R. and Birchmeier, W. (1996): Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1, *Nature* 382 [6592], pp. 638-642. URL: PM:8757136
- [58] Huber, O.; Korn, R.; McLaughlin, J.; Ohsugi, M.; Herrmann, B. G. and Kemler, R. (1996): Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1, *Mech Dev* 59 [1], pp. 3-10. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8892228](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8892228)
- [59] Molenaar, M.; van de Wetering, M.; Oosterwegel, M.; Peterson-Maduro, J.; Godsave, S.; Korinek, V.; Roose, J.; Destree, O. and Clevers, H. (1996): XTcf-3

- transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos, *Cell* 86 [3], pp. 391-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8756721](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8756721)
- [60] Peifer, M.; Sweeton, D.; Casey, M. and Wieschaus, E. (1994): wingless signal and Zeste-white 3 kinase trigger opposing changes in the intracellular distribution of Armadillo, *Development* 120 [2], pp. 369-80. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8149915](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8149915)
- [61] van Leeuwen, F.; Samos, C. H. and Nusse, R. (1994): Biological activity of soluble wingless protein in cultured *Drosophila* imaginal disc cells, *Nature* 368 [6469], pp. 342-4. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8127369](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8127369)
- [62] Munemitsu, S.; Albert, I.; Souza, B.; Rubinfeld, B. and Polakis, P. (1995): Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92 [7], pp. 3046-3050. URL: PM:7708772
- [63] Behrens, J.; Jerchow, B. A.; Wurtele, M.; Grimm, J.; Asbrand, C.; Wirtz, R.; Kuhl, M.; Wedlich, D. and Birchmeier, W. (1998): Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta, *Science* 280 [5363], pp. 596-599. URL: PM:9554852
- [64] Hart, M. J.; de los Santos, R.; Albert, I. N.; Rubinfeld, B. and Polakis, P. (1998): Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta, *Curr Biol* 8 [10], pp. 573-81. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9601641](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9601641)
- [65] Itoh, K.; Krupnik, V. E. and Sokol, S. Y. (1998): Axis determination in *Xenopus* involves biochemical interactions of axin, glycogen synthase kinase 3 and beta-catenin, *Curr Biol* 8 [10], pp. 591-4. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9601644](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9601644)
- [66] Peters, J. M.; McKay, R. M.; McKay, J. P. and Graff, J. M. (1999): Casein kinase I transduces Wnt signals, *Nature* 401 [6751], pp. 345-50. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10517632](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10517632)
- [67] Sakanaka, C.; Leong, P.; Xu, L.; Harrison, S. D. and Williams, L. T. (1999): Casein kinase Iepsilon in the wnt pathway: regulation of beta-catenin function, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [22], pp. 12548-52. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10535959](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10535959)
- [68] Amit, S.; Hatzubai, A.; Birman, Y.; Andersen, J. S.; Ben-Shushan, E.; Mann, M.; Ben-Neriah, Y. and Alkalay, I. (2002): Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway, *Genes Dev* 16 [9], pp. 1066-76. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12000790](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12000790)
- [69] Liu, C.; Li, Y.; Semenov, M.; Han, C.; Baeg, G. H.; Tan, Y.; Zhang, Z.; Lin, X. and He, X. (2002): Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism, *Cell* 108 [6], pp. 837-47. URL:



- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11955436](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11955436)
- [70] Yanagawa, S.; Matsuda, Y.; Lee, J. S.; Matsubayashi, H.; Sese, S.; Kadowaki, T. and Ishimoto, A. (2002): Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in *Drosophila*, *Embo J* 21 [7], pp. 1733-42. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11927557](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11927557)
- [71] Aberle, H.; Bauer, A.; Stappert, J.; Kispert, A. and Kemler, R. (1997): beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway, *Embo J* 16 [13], pp. 3797-804. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9233789](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9233789)
- [72] Salomon, D.; Sacco, P. A.; Roy, S. G.; Simcha, I.; Johnson, K. R.; Wheelock, M. J. and Ben-Ze'ev, A. (1997): Regulation of beta-catenin levels and localization by overexpression of plakoglobin and inhibition of the ubiquitin-proteasome system, *J Cell Biol* 139 [5], pp. 1325-35. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9382877](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9382877)
- [73] Jiang, J. and Struhl, G. (1998): Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb, *Nature* 391 [6666], pp. 493-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9461217](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9461217)
- [74] Marikawa, Y. and Elinson, R. P. (1998): beta-TrCP is a negative regulator of Wnt/beta-catenin signaling pathway and dorsal axis formation in *Xenopus* embryos, *Mech Dev* 77 [1], pp. 75-80. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9784611](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9784611)
- [75] Klaus, A. and Birchmeier, W. (2008): Wnt signalling and its impact on development and cancer, *Nat Rev Cancer* 8, p. 12.
- [76] Cavallo, R. A.; Cox, R. T.; Moline, M. M.; Roose, J.; Polevoy, G. A.; Clevers, H.; Peifer, M. and Bejsovec, A. (1998): *Drosophila* Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity, *Nature* 395 [6702], pp. 604-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9783586](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9783586)
- [77] Levanon, D.; Goldstein, R. E.; Bernstein, Y.; Tang, H.; Goldenberg, D.; Stifani, S.; Paroush, Z. and Groner, Y. (1998): Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [20], pp. 11590-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9751710](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9751710)
- [78] Roose, J.; Molenaar, M.; Peterson, J.; Hurenkamp, J.; Brantjes, H.; Moerer, P.; van de Wetering, M.; Destree, O. and Clevers, H. (1998): The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors, *Nature* 395 [6702], pp. 608-12. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9783587](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9783587)
- [79] Pinson, K. I.; Brennan, J.; Monkley, S.; Avery, B. J. and Skarnes, W. C. (2000): An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice, *Nature* 407 [6803], pp. 535-8. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11029008](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11029008)
- [80] Tamai, K.; Semenov, M.; Kato, Y.; Spokony, R.; Liu, C.; Katsuyama, Y.; Hess, F.; Saint-Jeannet, J. P. and He, X. (2000): LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction, *Nature* 407 [6803], pp. 530-535. URL: PM:11029007
- [81] Wehrli, M.; Dougan, S. T.; Caldwell, K.; O'Keefe, L.; Schwartz, S.; Vaizel-Ohayon, D.; Schejter, E.; Tomlinson, A. and DiNardo, S. (2000): arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling, *Nature* 407 [6803], pp. 527-30. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11029006](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11029006)
- [82] Finch, P. W.; He, X.; Kelley, M. J.; Uren, A.; Schaudies, R. P.; Popescu, N. C.; Rudikoff, S.; Aaronson, S. A.; Varmus, H. E. and Rubin, J. S. (1997): Purification and molecular cloning of a secreted, Frizzled-related antagonist of Wnt action, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94 [13], pp. 6770-6775. URL: PM:9192640
- [83] Leyns, L.; Bouwmeester, T.; Kim, S. H.; Piccolo, S. and De Robertis, E. M. (1997): Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer, *Cell* 88 [6], pp. 747-756. URL: PM:9118218
- [84] Hsieh, J. C.; Kodjabachian, L.; Rebbert, M. L.; Rattner, A.; Smallwood, P. M.; Samos, C. H.; Nusse, R.; Dawid, I. B. and Nathans, J. (1999): A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities, *Nature* 398 [6726], pp. 431-436. URL: PM:10201374
- [85] Glinka, A.; Wu, W.; Delius, H.; Monaghan, A. P.; Blumenstock, C. and Niehrs, C. (1998): Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction, *Nature* 391 [6665], pp. 357-62. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9450748](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9450748)
- [86] Mao, B.; Wu, W.; Davidson, G.; Marhold, J.; Li, M.; Mechler, B. M.; Delius, H.; Hoppe, D.; Stannek, P.; Walter, C.; Glinka, A. and Niehrs, C. (2002): Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling, *Nature* 417 [6889], pp. 664-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12050670](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12050670)
- [87] Davidson, G.; Wu, W.; Shen, J.; Bilic, J.; Fenger, U.; Stannek, P.; Glinka, A. and Niehrs, C. (2005): Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction, *Nature* 438 [7069], pp. 867-72. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16341016](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16341016)
- [88] Zeng, X.; Tamai, K.; Doble, B.; Li, S.; Huang, H.; Habas, R.; Okamura, H.; Woodgett, J. and He, X. (2005): A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation, *Nature* 438 [7069], pp. 873-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16341017](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16341017)
- [89] Bilic, J.; Huang, Y. L.; Davidson, G.; Zimmermann, T.; Cruciat, C. M.; Bienz, M. and Niehrs, C. (2007): Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation, *Science* 316 [5831], pp. 1619-22. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17569865](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17569865)
- [90] Schwarz-Romond, T.; Fiedler, M.; Shibata, N.; Butler, P. J.; Kikuchi, A.; Higuchi, Y. and Bienz, M. (2007): The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling

- by dynamic polymerization, *Nat Struct Mol Biol* 14 [6], pp. 484-92. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17529994](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17529994)
- [91] Mao, J.; Wang, J.; Liu, B.; Pan, W.; Farr, G. H., 3rd; Flynn, C.; Yuan, H.; Takada, S.; Kimelman, D.; Li, L. and Wu, D. (2001): Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway, *Mol Cell* 7 [4], pp. 801-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11336703](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11336703)
- [92] Hecht, A.; Vleminckx, K.; Stemmler, M. P.; van Roy, F. and Kemler, R. (2000): The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates, *Embo J* 19 [8], pp. 1839-50. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10775268](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10775268)
- [93] Kramps, T.; Peter, O.; Brunner, E.; Nellen, D.; Froesch, B.; Chatterjee, S.; Murone, M.; Zullig, S. and Basler, K. (2002): Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex, *Cell* 109 [1], pp. 47-60. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11955446](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11955446)
- [94] Parker, D. S.; Jemison, J. and Cadigan, K. M. (2002): Pygopus, a nuclear PHD-finger protein required for Wingless signaling in *Drosophila*, *Development* 129 [11], pp. 2565-76. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12015286](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12015286)
- [95] Thompson, B.; Townsley, F.; Rosin-Arbesfeld, R.; Musisi, H. and Bienz, M. (2002): A new nuclear component of the Wnt signalling pathway, *Nat Cell Biol* 4 [5], pp. 367-73. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11988739](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11988739)
- [96] Wolf, D.; Rodova, M.; Miska, E. A.; Calvet, J. P. and Kouzarides, T. (2002): Acetylation of beta-catenin by CREB-binding protein (CBP), *J Biol Chem* 277 [28], pp. 25562-7. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11973335](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11973335)
- [97] Brembeck, F. H.; Schwarz-Romond, T.; Bakkers, J.; Wilhelm, S.; Hammerschmidt, M. and Birchmeier, W. (2004): Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions, *Genes Dev* 18 [18], pp. 2225-30. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15371335](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15371335)
- [98] Daniels, D. L. and Weis, W. I. (2005): Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation, *Nat Struct Mol Biol* 12 [4], pp. 364-71. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15768032](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15768032)
- [99] Riese, J.; Yu, X.; Munnerlyn, A.; Eresh, S.; Hsu, S. C.; Grosschedl, R. and Bienz, M. (1997): LEF-1, a nuclear factor coordinating signaling inputs from wingless and decapentaplegic, *Cell* 88 [6], pp. 777-87. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9118221](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9118221)

- [100] He, T. C.; Sparks, A. B.; Rago, C.; Hermeking, H.; Zawel, L.; da Costa, L. T.; Morin, P. J.; Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1998): Identification of c-MYC as a target of the APC pathway, *Science* 281 [5382], pp. 1509-12. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9727977](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9727977)
- [101] Spemann, H. and Mangold, H. (1924): Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren, *Wilhelm Roux Arch Entw Mech Org.* 100, pp. 599-638.
- [102] Morgan, TH. (1902): The relation between normal and abnormal development of the embryo of the frog, as determined by the effect of lithium chloride in solution, *Archiv für Entwicklungsmechanik.* XVI, pp. 691-716.
- [103] McMahon, A. P. and Moon, R. T. (1989): Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis, *Cell* 58 [6], pp. 1075-1084. URL: PM:2673541
- [104] Glinka, A.; Delius, H.; Blumenstock, C. and Niehrs, C. (1996): Combinatorial signalling by Xwnt-11 and Xnr3 in the organizer epithelium, *Mech Dev* 60 [2], pp. 221-31. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9025074](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9025074)
- [105] Klein, P. S. and Melton, D. A. (1996): A molecular mechanism for the effect of lithium on development, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 [16], pp. 8455-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8710892](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8710892)
- [106] Marikawa, Y. (2006): Wnt/beta-catenin signaling and body plan formation in mouse embryos, *Semin Cell Dev Biol* 17 [2], pp. 175-84. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16765611](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16765611)
- [107] Grigoryan, T.; Wend, P.; Klaus, A. and Birchmeier, W. (2008): Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice, *Genes Dev* 22 [17], pp. 2308-41. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18765787](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18765787)
- [108] Marson, A.; Foreman, R.; Chevalier, B.; Bilodeau, S.; Kahn, M.; Young, R. A. and Jaenisch, R. (2008): Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency, *Cell Stem Cell* 3 [2], pp. 132-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18682236](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18682236)
- [109] Sato, N.; Meijer, L.; Skaltsounis, L.; Greengard, P. and Brivanlou, A. H. (2004): Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor, *Nat Med* 10 [1], pp. 55-63. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14702635](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14702635)
- [110] Zechner, D.; Fujita, Y.; Hulsken, J.; Muller, T.; Walther, I.; Taketo, M. M.; Crenshaw, E. B., III; Birchmeier, W. and Birchmeier, C. (2003): beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system, *Dev Biol.* 258 [2], pp. 406-418. URL: PM:12798297

- [111] Hill, T. P.; Spater, D.; Taketo, M. M.; Birchmeier, W. and Hartmann, C. (2005): Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes, *Dev.Cell* 8 [5], pp. 727-738. URL: PM:15866163
- [112] Olson, L. E.; Tollkuhn, J.; Scafoglio, C.; Krones, A.; Zhang, J.; Ohgi, K. A.; Wu, W.; Taketo, M. M.; Kemler, R.; Grosschedl, R.; Rose, D.; Li, X. and Rosenfeld, M. G. (2006): Homeodomain-mediated beta-catenin-dependent switching events dictate cell-lineage determination, *Cell* 125 [3], pp. 593-605. URL: PM:16678101
- [113] Zechner, D.; Muller, T.; Wende, H.; Walther, I.; Taketo, M. M.; Crenshaw, E. B., III; Treier, M.; Birchmeier, W. and Birchmeier, C. (2007): Bmp and Wnt/beta-catenin signals control expression of the transcription factor Olig3 and the specification of spinal cord neurons, *Dev.Biol.* 303 [1], pp. 181-190. URL: PM:17150208
- [114] Müller, T.; Anlag, K.; Wildner, H.; Britsch, S.; Treier, M. and Birchmeier, C. (2005): The bHLH factor Olig3 coordinates the specification of dorsal neurons in the spinal cord, *Genes Dev.* 19 [6], pp. 733-743. URL: PM:15769945
- [115] Huelsken, J.; Vogel, R.; Erdmann, B.; Cotsarelis, G. and Birchmeier, W. (2001): Beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin, *Cell* 105 [4], pp. 533-545. URL: PM:11371349
- [116] Korinek, V.; Barker, N.; Moerer, P.; van Donselaar, E.; Huls, G.; Peters, P. J. and Clevers, H. (1998): Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4, *Nat.Genet.* 19 [4], pp. 379-383. URL: PM:9697701
- [117] Reya, T.; Duncan, A. W.; Ailles, L.; Domen, J.; Scherer, D. C.; Willert, K.; Hintz, L.; Nüsse, R. and Weissman, I. L. (2003): A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells, *Nature* 423 [6938], pp. 409-414. URL: PM:12717450
- [118] Kuhnert, F.; Davis, C. R.; Wang, H. T.; Chu, P.; Lee, M.; Yuan, J.; Nüsse, R. and Kuo, C. J. (2004): Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 [1], pp. 266-71. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14695885](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14695885)
- [119] Fevr, T.; Robine, S.; Louvard, D. and Huelsken, J. (2007): Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells, *Mol.Cell Biol.* 27 [21], pp. 7551-7559. URL: PM:17785439
- [120] Moser, A. R.; Pitot, H. C. and Dove, W. F. (1990): A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse, *Science* 247 [4940], pp. 322-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2296722](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2296722)
- [121] Oshima, M.; Oshima, H.; Kitagawa, K.; Kobayashi, M.; Itakura, C. and Taketo, M. (1995): Loss of Apc heterozygosity and abnormal tissue building in nascent intestinal polyps in mice carrying a truncated Apc gene, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92 [10], pp. 4482-4486. URL: PM:7753829
- [122] Harada, N.; Tamai, Y.; Ishikawa, T.; Sauer, B.; Takaku, K.; Oshima, M. and Taketo, M. M. (1999): Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene, *EMBO J.* 18 [21], pp. 5931-5942. URL: PM:10545105
- [123] Wehkamp, J.; Wang, G.; Kubler, I.; Nuding, S.; Gregorieff, A.; Schnabel, A.; Kays, R. J.; Fellermann, K.; Burk, O.; Schwab, M.; Clevers, H.; Bevins, C. L. and Stange, E. F. (2007): The Paneth cell alpha-defensin deficiency of ileal Crohn's



- disease is linked to Wnt/Tcf-4, *J Immunol* 179 [5], pp. 3109-18. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17709525](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17709525)
- [124] Zhao, J.; Kim, K. A.; De Vera, J.; Palencia, S.; Wagle, M. and Abo, A. (2009): R-Spondin1 protects mice from chemotherapy or radiation-induced oral mucositis through the canonical Wnt/beta-catenin pathway, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 [7], pp. 2331-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19179402](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19179402)
- [125] Kobiela, K.; Stokes, N.; de la, Cruz J.; Polak, L. and Fuchs, E. (2007): Loss of a quiescent niche but not follicle stem cells in the absence of bone morphogenetic protein signaling, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104 [24], pp. 10063-10068. URL: PM:17553962
- [126] Plikus, M. V.; Mayer, J. A.; de la, Cruz D.; Baker, R. E.; Maini, P. K.; Maxson, R. and Chuong, C. M. (2008): Cyclic dermal BMP signalling regulates stem cell activation during hair regeneration, *Nature* 451 [7176], pp. 340-344. URL: PM:18202659
- [127] Gat, U.; DasGupta, R.; Degenstein, L. and Fuchs, E. (1998): De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin, *Cell* 95 [5], pp. 605-614. URL: PM:9845363
- [128] Ming Kwan, K.; Li, A. G.; Wang, X. J.; Wurst, W. and Behringer, R. R. (2004): Essential roles of BMPR-IA signaling in differentiation and growth of hair follicles and in skin tumorigenesis, *Genesis* 39 [1], pp. 10-25. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15124223](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15124223)
- [129] Schmierer, B. and Hill, C. S. (2007): TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility, *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 [12], pp. 970-82. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18000526](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18000526)
- [130] Dubois, C. M.; Laprise, M. H.; Blanchette, F.; Gentry, L. E. and Leduc, R. (1995): Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase, *J Biol Chem* 270 [18], pp. 10618-24. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7737999](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7737999)
- [131] Constam, D. B. and Robertson, E. J. (1999): Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases, *J Cell Biol* 144 [1], pp. 139-49. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9885250](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9885250)
- [132] Wrana, J. L.; Attisano, L.; Wieser, R.; Ventura, F. and Massague, J. (1994): Mechanism of activation of the TGF-beta receptor, *Nature* 370 [6488], pp. 341-7. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8047140](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8047140)
- [133] Massague, J.; Seoane, J. and Wotton, D. (2005): Smad transcription factors, *Genes Dev* 19 [23], pp. 2783-810. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16322555](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16322555)
- [134] Carcamo, J.; Weis, F. M.; Ventura, F.; Wieser, R.; Wrana, J. L.; Attisano, L. and Massague, J. (1994): Type I receptors specify growth-inhibitory and

- transcriptional responses to transforming growth factor beta and activin, *Mol Cell Biol* 14 [6], pp. 3810-21. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8196624](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8196624)
- [135] Hoodless, P. A.; Haerry, T.; Abdollah, S.; Stapleton, M.; O'Connor, M. B.; Attisano, L. and Wrana, J. L. (1996): MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways, *Cell* 85 [4], pp. 489-500. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8653785](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8653785)
- [136] Macias-Silva, M.; Abdollah, S.; Hoodless, P. A.; Pirone, R.; Attisano, L. and Wrana, J. L. (1996): MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling, *Cell* 87 [7], pp. 1215-24. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8980228](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8980228)
- [137] Zhang, Y.; Feng, X.; We, R. and Derynck, R. (1996): Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response, *Nature* 383 [6596], pp. 168-72. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8774881](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8774881)
- [138] Nishimura, R.; Kato, Y.; Chen, D.; Harris, S. E.; Mundy, G. R. and Yoneda, T. (1998): Smad5 and DPC4 are key molecules in mediating BMP-2-induced osteoblastic differentiation of the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12, *J Biol Chem* 273 [4], pp. 1872-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9442019](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9442019)
- [139] Kawai, S.; Faucheu, C.; Gallea, S.; Spinella-Jaegle, S.; Atfi, A.; Baron, R. and Roman, S. R. (2000): Mouse smad8 phosphorylation downstream of BMP receptors ALK-2, ALK-3, and ALK-6 induces its association with Smad4 and transcriptional activity, *Biochem Biophys Res Commun* 271 [3], pp. 682-7. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10814522](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10814522)
- [140] Zwijsen, A.; Verschueren, K. and Huylebroeck, D. (2003): New intracellular components of bone morphogenetic protein/Smad signaling cascades, *FEBS Lett* 546 [1], pp. 133-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12829249](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12829249)
- [141] Wang, T.; Li, B. Y.; Danielson, P. D.; Shah, P. C.; Rockwell, S.; Lechleider, R. J.; Martin, J.; Manganaro, T. and Donahoe, P. K. (1996): The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF beta family type I receptors, *Cell* 86 [3], pp. 435-44. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8756725](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8756725)
- [142] Chen, Y. G.; Liu, F. and Massague, J. (1997): Mechanism of TGFbeta receptor inhibition by FKBP12, *Embo J* 16 [13], pp. 3866-76. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9233797](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9233797)
- [143] Shi, Y. and Massague, J. (2003): Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus, *Cell* 113 [6], pp. 685-700. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12809600](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12809600)

- [144] Hardwick, J. C.; Kodach, L. L.; Offerhaus, G. J. and van den Brink, G. R. (2008): Bone morphogenetic protein signalling in colorectal cancer, *Nat Rev Cancer* 8 [10], pp. 806-12. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18756288](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18756288)
- [145] Kretschmar, M.; Liu, F.; Hata, A.; Doody, J. and Massague, J. (1997): The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase, *Genes Dev* 11 [8], pp. 984-95. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9136927](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9136927)
- [146] Massague, J. (1996): TGFbeta signaling: receptors, transducers, and Mad proteins, *Cell* 85 [7], pp. 947-50. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8674122](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8674122)
- [147] Heldin, C. H.; Miyazono, K. and ten Dijke, P. (1997): TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins, *Nature* 390 [6659], pp. 465-71. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9393997](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9393997)
- [148] Chacko, B. M.; Qin, B. Y.; Tiwari, A.; Shi, G.; Lam, S.; Hayward, L. J.; De Caestecker, M. and Lin, K. (2004): Structural basis of heteromeric smad protein assembly in TGF-beta signaling, *Mol Cell* 15 [5], pp. 813-23. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15350224](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15350224)
- [149] Liu, F.; Hata, A.; Baker, J. C.; Doody, J.; Carcamo, J.; Harland, R. M. and Massague, J. (1996): A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator, *Nature* 381 [6583], pp. 620-3. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8637600](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8637600)
- [150] Feng, X. H.; Zhang, Y.; Wu, R. Y. and Derynck, R. (1998): The tumor suppressor Smad4/DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for smad3 in TGF-beta-induced transcriptional activation, *Genes Dev* 12 [14], pp. 2153-63. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9679060](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9679060)
- [151] Janknecht, R.; Wells, N. J. and Hunter, T. (1998): TGF-beta-stimulated cooperation of smad proteins with the coactivators CBP/p300, *Genes Dev* 12 [14], pp. 2114-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9679056](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9679056)
- [152] Hata, A.; Seoane, J.; Lagna, G.; Montalvo, E.; Hemmati-Brivanlou, A. and Massague, J. (2000): OAZ uses distinct DNA- and protein-binding zinc fingers in separate BMP-Smad and Olf signaling pathways, *Cell* 100 [2], pp. 229-40. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10660046](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10660046)
- [153] Yamaguchi, K.; Shirakabe, K.; Shibuya, H.; Irie, K.; Oishi, I.; Ueno, N.; Taniguchi, T.; Nishida, E. and Matsumoto, K. (1995): Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction, *Science* 270 [5244], pp. 2008-11. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8533096](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8533096)



- [154] Yamaguchi, K.; Nagai, S.; Ninomiya-Tsuji, J.; Nishita, M.; Tamai, K.; Irie, K.; Ueno, N.; Nishida, E.; Shibuya, H. and Matsumoto, K. (1999): XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway, *Embo J* 18 [1], pp. 179-87. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9878061](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9878061)
- [155] Fuentealba, L. C.; Eivers, E.; Ikeda, A.; Hurtado, C.; Kuroda, H.; Pera, E. M. and De Robertis, E. M. (2007): Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal, *Cell* 131 [5], pp. 980-93. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18045539](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18045539)
- [156] Zeng, Y. A.; Rahnama, M.; Wang, S.; Sosu-Sedzorme, W. and Verheyen, E. M. (2007): Drosophila Nemo antagonizes BMP signaling by phosphorylation of Mad and inhibition of its nuclear accumulation, *Development* 134 [11], pp. 2061-71. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17507407](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17507407)
- [157] Ishitani, T.; Ninomiya-Tsuji, J.; Nagai, S.; Nishita, M.; Meneghini, M.; Barker, N.; Waterman, M.; Bowerman, B.; Clevers, H.; Shibuya, H. and Matsumoto, K. (1999): The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF, *Nature* 399 [6738], pp. 798-802. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10391247](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10391247)
- [158] Piccolo, S.; Sasai, Y.; Lu, B. and De Robertis, E. M. (1996): Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4, *Cell* 86 [4], pp. 589-98. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8752213](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8752213)
- [159] Zimmerman, L. B.; De Jesus-Escobar, J. M. and Harland, R. M. (1996): The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4, *Cell* 86 [4], pp. 599-606. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8752214](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8752214)
- [160] Hsu, D. R.; Economides, A. N.; Wang, X.; Eimon, P. M. and Harland, R. M. (1998): The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities, *Mol Cell* 1 [5], pp. 673-83. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9660951](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9660951)
- [161] Wang, X. P.; Suomalainen, M.; Jorgez, C. J.; Matzuk, M. M.; Werner, S. and Thesleff, I. (2004): Follistatin regulates enamel patterning in mouse incisors by asymmetrically inhibiting BMP signaling and ameloblast differentiation, *Dev Cell* 7 [5], pp. 719-30. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15525533](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15525533)
- [162] Onichtchouk, D.; Chen, Y. G.; Dosch, R.; Gawantka, V.; Delius, H.; Massague, J. and Niehrs, C. (1999): Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI, *Nature* 401 [6752], pp. 480-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10519551](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10519551)
- [163] Grotewold, L.; Plum, M.; Dildrop, R.; Peters, T. and Ruther, U. (2001): Bambi is coexpressed with Bmp-4 during mouse embryogenesis, *Mech Dev* 100 [2], pp.

- 327-30. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11165491](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11165491)
- [164] Souchelnytskyi, S.; Nakayama, T.; Nakao, A.; Moren, A.; Heldin, C. H.; Christian, J. L. and ten Dijke, P. (1998): Physical and functional interaction of murine and *Xenopus* Smad7 with bone morphogenetic protein receptors and transforming growth factor-beta receptors, *J Biol Chem* 273 [39], pp. 25364-70. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9738003](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9738003)
- [165] Hata, A.; Lagna, G.; Massague, J. and Hemmati-Brivanlou, A. (1998): Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor, *Genes Dev* 12 [2], pp. 186-97. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9436979](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9436979)
- [166] Zhang, Y.; Chang, C.; Gehling, D. J.; Hemmati-Brivanlou, A. and Derynck, R. (2001): Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 [3], pp. 974-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11158580](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11158580)
- [167] Murakami, G.; Watabe, T.; Takaoka, K.; Miyazono, K. and Imamura, T. (2003): Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads, *Mol Biol Cell* 14 [7], pp. 2809-17. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12857866](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12857866)
- [168] Urist, M. R. (1965): Bone: formation by autoinduction, *Science* 150 [698], pp. 893-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=5319761](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5319761)
- [169] Urist, M. R. (1997): Bone morphogenetic protein: the molecularization of skeletal system development, *J Bone Miner Res* 12 [3], pp. 343-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9076576](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9076576)
- [170] Green, M. C. (1958): Effects of the short ear gene in the mouse on cartilage formation in healing bone fractures, *J Exp Zool* 137 [1], pp. 75-88. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=13563786](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13563786)
- [171] Kingsley, D. M.; Bland, A. E.; Grubber, J. M.; Marker, P. C.; Russell, L. B.; Copeland, N. G. and Jenkins, N. A. (1992): The mouse short ear skeletal morphogenesis locus is associated with defects in a bone morphogenetic member of the TGF beta superfamily, *Cell* 71 [3], pp. 399-410. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1339316](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1339316)
- [172] King, J. A.; Marker, P. C.; Seung, K. J. and Kingsley, D. M. (1994): BMP5 and the molecular, skeletal, and soft-tissue alterations in short ear mice, *Dev Biol* 166 [1], pp. 112-22. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7958439](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7958439)
- [173] Brunet, L. J.; McMahon, J. A.; McMahon, A. P. and Harland, R. M. (1998): Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton, *Science* 280 [5368], pp. 1455-7. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9603738](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9603738)
- [174] Solloway, M. J.; Dudley, A. T.; Bikoff, E. K.; Lyons, K. M.; Hogan, B. L. and Robertson, E. J. (1998): Mice lacking Bmp6 function, *Dev Genet* 22 [4], pp. 321-39. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9664685](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9664685)
- [175] Baur, S. T.; Mai, J. J. and Dymecki, S. M. (2000): Combinatorial signaling through BMP receptor IB and GDF5: shaping of the distal mouse limb and the genetics of distal limb diversity, *Development* 127 [3], pp. 605-19. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10631181](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10631181)
- [176] Yi, S. E.; Daluiski, A.; Pederson, R.; Rosen, V. and Lyons, K. M. (2000): The type I BMP receptor BMPRII is required for chondrogenesis in the mouse limb, *Development* 127 [3], pp. 621-30. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10631182](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10631182)
- [177] Zou, H.; Wieser, R.; Massague, J. and Niswander, L. (1997): Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage, *Genes Dev* 11 [17], pp. 2191-203. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9303535](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9303535)
- [178] Mishina, Y. (2003): Function of bone morphogenetic protein signaling during mouse development, *Front Biosci* 8, pp. d855-69. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12700086](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12700086)
- [179] Goumans, M. J. and Mummery, C. (2000): Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice, *Int J Dev Biol* 44 [3], pp. 253-65. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10853822](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10853822)
- [180] Kishigami, S. and Mishina, Y. (2005): BMP signaling and early embryonic patterning, *Cytokine Growth Factor Rev* 16 [3], pp. 265-78. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15871922](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15871922)
- [181] Mishina, Y.; Suzuki, A.; Ueno, N. and Behringer, R. R. (1995): Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis, *Genes Dev* 9 [24], pp. 3027-37. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8543149](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8543149)
- [182] Winnier, G.; Blessing, M.; Labosky, P. A. and Hogan, B. L. (1995): Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse, *Genes Dev* 9 [17], pp. 2105-16. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7657163](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7657163)
- [183] Mishina, Y.; Crombie, R.; Bradley, A. and Behringer, R. R. (1999): Multiple roles for activin-like kinase-2 signaling during mouse embryogenesis, *Dev Biol* 213 [2], pp. 314-26. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10479450](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10479450)

- [184] Beppu, H.; Kawabata, M.; Hamamoto, T.; Chytil, A.; Minowa, O.; Noda, T. and Miyazono, K. (2000): BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos, *Dev Biol* 221 [1], pp. 249-58. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10772805](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10772805)
- [185] de Sousa Lopes, S. M.; Roelen, B. A.; Monteiro, R. M.; Emmens, R.; Lin, H. Y.; Li, E.; Lawson, K. A. and Mummery, C. L. (2004): BMP signaling mediated by ALK2 in the visceral endoderm is necessary for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo, *Genes Dev* 18 [15], pp. 1838-49. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15289457](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15289457)
- [186] Arnold, S. J.; Maretto, S.; Islam, A.; Bikoff, E. K. and Robertson, E. J. (2006): Dose-dependent Smad1, Smad5 and Smad8 signaling in the early mouse embryo, *Dev Biol* 296 [1], pp. 104-18. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16765933](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16765933)
- [187] Wagner, T. U. (2007): Bone morphogenetic protein signaling in stem cells--one signal, many consequences, *Febs J* 274 [12], pp. 2968-76. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17521338](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17521338)
- [188] Lee, K. J.; Mendelsohn, M. and Jessell, T. M. (1998): Neuronal patterning by BMPs: a requirement for GDF7 in the generation of a discrete class of commissural interneurons in the mouse spinal cord, *Genes Dev* 12 [21], pp. 3394-407. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9808626](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9808626)
- [189] Bermingham, N. A.; Hassan, B. A.; Wang, V. Y.; Fernandez, M.; Banfi, S.; Bellen, H. J.; Frittsch, B. and Zoghbi, H. Y. (2001): Proprioceptor pathway development is dependent on Math1, *Neuron* 30 [2], pp. 411-22. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11395003](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11395003)
- [190] Wine-Lee, L.; Ahn, K. J.; Richardson, R. D.; Mishina, Y.; Lyons, K. M. and Crenshaw, E. B., III (2004): Signaling through BMP type 1 receptors is required for development of interneuron cell types in the dorsal spinal cord, *Development* 131 [21], pp. 5393-5403. URL: PM:15469980
- [191] Graham, A.; Francis-West, P.; Brickell, P. and Lumsden, A. (1994): The signalling molecule BMP4 mediates apoptosis in the rhombencephalic neural crest, *Nature* 372 [6507], pp. 684-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7990961](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7990961)
- [192] Hogan, B. L. (1996): Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development, *Genes Dev* 10 [13], pp. 1580-94. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8682290](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8682290)
- [193] Fogarty, M. P.; Kessler, J. D. and Wechsler-Reya, R. J. (2005): Morphing into cancer: the role of developmental signaling pathways in brain tumor formation, *J Neurobiol* 64 [4], pp. 458-75. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16041741](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16041741)
- [194] Liu, A. and Niswander, L. A. (2005): Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development, *Nat Rev Neurosci* 6 [12], pp. 945-54.

- URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16340955](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16340955)
- [195] He, X. C.; Zhang, J.; Tong, W. G.; Tawfik, O.; Ross, J.; Scoville, D. H.; Tian, Q.; Zeng, X.; He, X.; Wiedemann, L. M.; Mishina, Y. and Li, L. (2004): BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling, *Nat Genet* 36 [10], pp. 1117-21. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15378062](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15378062)
- [196] Mishra, L.; Derynck, R. and Mishra, B. (2005): Transforming growth factor-beta signaling in stem cells and cancer, *Science* 310 [5745], pp. 68-71. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16210527](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16210527)
- [197] Gross, R. E.; Mehler, M. F.; Mabie, P. C.; Zang, Z.; Santschi, L. and Kessler, J. A. (1996): Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells, *Neuron* 17 [4], pp. 595-606. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8893018](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8893018)
- [198] Mehler, M. F.; Mabie, P. C.; Zhu, G.; Gokhan, S. and Kessler, J. A. (2000): Developmental changes in progenitor cell responsiveness to bone morphogenetic proteins differentially modulate progressive CNS lineage fate, *Dev Neurosci* 22 [1-2], pp. 74-85. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10657700](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10657700)
- [199] Gomes, W. A.; Mehler, M. F. and Kessler, J. A. (2003): Transgenic overexpression of BMP4 increases astroglial and decreases oligodendroglial lineage commitment, *Dev Biol* 255 [1], pp. 164-77. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12618141](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12618141)
- [200] Anderson, R. M.; Lawrence, A. R.; Stottmann, R. W.; Bachiller, D. and Klingensmith, J. (2002): Chordin and noggin promote organizing centers of forebrain development in the mouse, *Development* 129 [21], pp. 4975-87. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12397106](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12397106)
- [201] Haramis, A. P.; Begthel, H.; van den Born, M.; van Es, J.; Jonkheer, S.; Offerhaus, G. J. and Clevers, H. (2004): De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine, *Science* 303 [5664], pp. 1684-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15017003](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15017003)
- [202] Howe, J. R.; Bair, J. L.; Sayed, M. G.; Anderson, M. E.; Mitros, F. A.; Petersen, G. M.; Velculescu, V. E.; Traverso, G. and Vogelstein, B. (2001): Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis, *Nat Genet* 28 [2], pp. 184-7. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11381269](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11381269)
- [203] Zhang, J.; He, X. C.; Tong, W. G.; Johnson, T.; Wiedemann, L. M.; Mishina, Y.; Feng, J. Q. and Li, L. (2006): Bone morphogenetic protein signaling inhibits hair follicle anagen induction by restricting epithelial stem/progenitor cell activation and expansion, *Stem Cells* 24 [12], pp. 2826-2839. URL: PM:16960130



- [204] Tucker, A. S. (2007): Salivary gland development, *Semin Cell Dev Biol* 18 [2], pp. 237-44. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17336109](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17336109)
- [205] Hedrich, Hans; Bullock, Gillian and Petrusz, Peter (2004): *The Laboratory Mouse (Handbook of Experimental Animals)*, Elsevier Academic Press, London, UK.
- [206] Junqueira, C.J.; Carneiro, J. and Kelley, R. O. (2001): *Histologie*, Springer Berlin 5. Auflage.
- [207] Ohuchi, H.; Hori, Y.; Yamasaki, M.; Harada, H.; Sekine, K.; Kato, S. and Itoh, N. (2000): FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development, *Biochem Biophys Res Commun* 277 [3], pp. 643-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11062007](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11062007)
- [208] Entesarian, M.; Matsson, H.; Klar, J.; Bergendal, B.; Olson, L.; Arakaki, R.; Hayashi, Y.; Ohuchi, H.; Falahat, B.; Bolstad, A. I.; Jonsson, R.; Wahren-Herlenius, M. and Dahl, N. (2005): Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor 10 are associated with aplasia of lacrimal and salivary glands, *Nat Genet* 37 [2], pp. 125-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15654336](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15654336)
- [209] Jaskoll, T.; Abichaker, G.; Witcher, D.; Sala, F. G.; Bellusci, S.; Hajihosseini, M. K. and Melnick, M. (2005): FGF10/FGFR2b signaling plays essential roles during in vivo embryonic submandibular salivary gland morphogenesis, *BMC Dev Biol* 5, p. 11. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15972105](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15972105)
- [210] De Moerloose, L.; Spencer-Dene, B.; Revest, J. M.; Hajihosseini, M.; Rosewell, I. and Dickson, C. (2000): An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis, *Development* 127 [3], pp. 483-92. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10631169](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10631169)
- [211] Jaskoll, T.; Zhou, Y. M.; Chai, Y.; Makarenkova, H. P.; Collinson, J. M.; West, J. D.; Hajihosseini, M. K.; Lee, J. and Melnick, M. (2002): Embryonic submandibular gland morphogenesis: stage-specific protein localization of FGFs, BMPs, Pax6 and Pax9 in normal mice and abnormal SMG phenotypes in FgfR2-IIIc(+/-Delta), BMP7(-/-) and Pax6(-/-) mice, *Cells Tissues Organs* 170 [2-3], pp. 83-98. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11731698](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11731698)
- [212] Jaskoll, T.; Witcher, D.; Toreno, L.; Bringas, P.; Moon, A. M. and Melnick, M. (2004): FGF8 dose-dependent regulation of embryonic submandibular salivary gland morphogenesis, *Dev Biol* 268 [2], pp. 457-69. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15063181](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15063181)
- [213] Jaskoll, T. and Melnick, M. (1999): Submandibular gland morphogenesis: stage-specific expression of TGF-alpha/EGF, IGF, TGF-beta, TNF, and IL-6 signal transduction in normal embryonic mice and the phenotypic effects of TGF-beta2, TGF-beta3, and EGF-r null mutations, *Anat Rec* 256 [3], pp. 252-68. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10521784](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10521784)

- [214] Peschon, J. J.; Slack, J. L.; Reddy, P.; Stocking, K. L.; Sunnarborg, S. W.; Lee, D. C.; Russell, W. E.; Castner, B. J.; Johnson, R. S.; Fitzner, J. N.; Boyce, R. W.; Nelson, N.; Kozlosky, C. J.; Wolfson, M. F.; Rauch, C. T.; Cerretti, D. P.; Paxton, R. J.; March, C. J. and Black, R. A. (1998): An essential role for ectodomain shedding in mammalian development, *Science* 282 [5392], pp. 1281-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9812885](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9812885)
- [215] Jaskoll, T.; Leo, T.; Witcher, D.; Ormestad, M.; Astorga, J.; Bringas, P., Jr.; Carlsson, P. and Melnick, M. (2004): Sonic hedgehog signaling plays an essential role during embryonic salivary gland epithelial branching morphogenesis, *Dev Dyn* 229 [4], pp. 722-32. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15042696](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15042696)
- [216] Rebutini, I. T.; Patel, V. N.; Stewart, J. S.; Layvey, A.; Georges-Labouesse, E.; Miner, J. H. and Hoffman, M. P. (2007): Laminin alpha5 is necessary for submandibular gland epithelial morphogenesis and influences FGFR expression through beta1 integrin signaling, *Dev Biol* 308 [1], pp. 15-29. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17601529](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17601529)
- [217] Menko, A. S.; Kreidberg, J. A.; Ryan, T. T.; Van Bockstaele, E. and Kukuruzinska, M. A. (2001): Loss of alpha3beta1 integrin function results in an altered differentiation program in the mouse submandibular gland, *Dev Dyn* 220 [4], pp. 337-49. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11307167](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11307167)
- [218] De Arcangelis, A.; Mark, M.; Kreidberg, J.; Sorokin, L. and Georges-Labouesse, E. (1999): Synergistic activities of alpha3 and alpha6 integrins are required during apical ectodermal ridge formation and organogenesis in the mouse, *Development* 126 [17], pp. 3957-68. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10433923](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10433923)
- [219] Oblander, S. A.; Zhou, Z.; Galvez, B. G.; Starcher, B.; Shannon, J. M.; Durbeek, M.; Arroyo, A. G.; Tryggvason, K. and Apte, S. S. (2005): Distinctive functions of membrane type 1 matrix-metalloprotease (MT1-MMP or MMP-14) in lung and submandibular gland development are independent of its role in pro-MMP-2 activation, *Dev Biol* 277 [1], pp. 255-69. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15572153](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15572153)
- [220] Melnick, M.; Petryk, A.; Abichaker, G.; Witcher, D.; Person, A. D. and Jaskoll, T. (2006): Embryonic salivary gland dysmorphogenesis in Twisted gastrulation deficient mice, *Arch Oral Biol* 51 [5], pp. 433-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16289463](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16289463)
- [221] Laclef, C.; Souil, E.; Demignon, J. and Maire, P. (2003): Thymus, kidney and craniofacial abnormalities in Six 1 deficient mice, *Mech Dev* 120 [6], pp. 669-79. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12834866](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12834866)
- [222] Yang, A.; Schweitzer, R.; Sun, D.; Kaghad, M.; Walker, N.; Bronson, R. T.; Tabin, C.; Sharpe, A.; Caput, D.; Crum, C. and McKeon, F. (1999): p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial

- development, *Nature* 398 [6729], pp. 714-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10227294](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10227294)
- [223] Szeto, D. P.; Rodriguez-Esteban, C.; Ryan, A. K.; O'Connell, S. M.; Liu, F.; Kioussi, C.; Gleiberman, A. S.; Izpisua-Belmonte, J. C. and Rosenfeld, M. G. (1999): Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development, *Genes Dev* 13 [4], pp. 484-94. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10049363](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10049363)
- [224] Davis, M. A. and Reynolds, A. B. (2006): Blocked acinar development, E-cadherin reduction, and intraepithelial neoplasia upon ablation of p120-catenin in the mouse salivary gland, *Dev Cell* 10 [1], pp. 21-31. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16399075](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16399075)
- [225] Melnick, M. and Jaskoll, T. (2000): Mouse submandibular gland morphogenesis: a paradigm for embryonic signal processing, *Crit Rev Oral Biol Med* 11 [2], pp. 199-215. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12002815](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12002815)
- [226] Blecher, S. R.; Debertin, M. and Murphy, J. S. (1983): Pleiotropic effect of Tabby gene on epidermal growth factor-containing cells of mouse submandibular gland, *Anat Rec* 207 [1], pp. 25-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6605698](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6605698)
- [227] Jaskoll, T.; Zhou, Y. M.; Trump, G. and Melnick, M. (2003): Ectodysplasin receptor-mediated signaling is essential for embryonic submandibular salivary gland development, *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 271 [2], pp. 322-31. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12629675](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12629675)
- [228] Carvalho, A. L.; Nishimoto, I. N.; Califano, J. A. and Kowalski, L. P. (2005): Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database, *Int J Cancer* 114 [5], pp. 806-16. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15609302](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15609302)
- [229] Seifert, G. (1997): [Diagnosis and prognosis of salivary gland tumors. An interpretation of new revised WHO classification], *Mund Kiefer Gesichtschir* 1 [5], pp. 252-67. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9410635](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9410635)
- [230] Eveson, J. W. and Cawson, R. A. (1985): Salivary gland tumours. A review of 2410 cases with particular reference to histological types, site, age and sex distribution, *J Pathol* 146 [1], pp. 51-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=4009321](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4009321)
- [231] Daphna-Iken, D.; Shankar, D. B.; Lawshe, A.; Ornitz, D. M.; Shackleford, G. M. and MacArthur, C. A. (1998): MMTV-Fgf8 transgenic mice develop mammary and salivary gland neoplasia and ovarian stromal hyperplasia, *Oncogene* 17 [21], pp. 2711-7. URL:



- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9840935](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9840935)
- [232] Declercq, J.; Van Dyck, F.; Braem, C. V.; Van Valckenborgh, I. C.; Voz, M.; Wassef, M.; Schoonjans, L.; Van Damme, B.; Fiette, L. and Van de Ven, W. J. (2005): Salivary gland tumors in transgenic mice with targeted PLAG1 proto-oncogene overexpression, *Cancer Res* 65 [11], pp. 4544-53. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15930271](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15930271)
- [233] Raimondi, A. R.; Vitale-Cross, L.; Amornphimoltham, P.; Gutkind, J. S. and Molinolo, A. (2006): Rapid development of salivary gland carcinomas upon conditional expression of K-ras driven by the cytokeratin 5 promoter, *Am J Pathol* 168 [5], pp. 1654-65. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16651631](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16651631)
- [234] Zhao, X.; Ren, W.; Yang, W.; Wang, Y.; Kong, H.; Wang, L.; Yan, L.; Xu, G.; Fei, J.; Fu, J.; Zhang, C. and Wang, Z. (2006): Wnt pathway is involved in pleomorphic adenomas induced by overexpression of PLAG1 in transgenic mice, *Int J Cancer* 118 [3], pp. 643-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16108035](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16108035)
- [235] Tsukamoto, A. S.; Grosschedl, R.; Guzman, R. C.; Parslow, T. and Varmus, H. E. (1988): Expression of the int-1 gene in transgenic mice is associated with mammary gland hyperplasia and adenocarcinomas in male and female mice, *Cell* 55 [4], pp. 619-625. URL: PM:3180222
- [236] Roose, J.; Huls, G.; van Beest, M.; Moerer, P.; van der Horn, K.; Goldschmeding, R.; Logtenberg, T. and Clevers, H. (1999): Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1, *Science* 285 [5435], pp. 1923-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10489374](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10489374)
- [237] Imbert, A.; Eelkema, R.; Jordan, S.; Feiner, H. and Cowin, P. (2001): Delta N89 beta-catenin induces precocious development, differentiation, and neoplasia in mammary gland, *J. Cell Biol.* 153 [3], pp. 555-568. URL: PM:11331306
- [238] Bierie, B.; Nozawa, M.; Renou, J. P.; Shillingford, J. M.; Morgan, F.; Oka, T.; Taketo, M. M.; Cardiff, R. D.; Miyoshi, K.; Wagner, K. U.; Robinson, G. W. and Hennighausen, L. (2003): Activation of beta-catenin in prostate epithelium induces hyperplasias and squamous transdifferentiation, *Oncogene* 22 [25], pp. 3875-87. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12813461](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12813461)
- [239] Konings, A. W.; Coppes, R. P. and Vissink, A. (2005): On the mechanism of salivary gland radiosensitivity, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 62 [4], pp. 1187-94. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15990024](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15990024)
- [240] Vissink, A.; Jansma, J.; Spijkervet, F. K.; Burlage, F. R. and Coppes, R. P. (2003): Oral sequelae of head and neck radiotherapy, *Crit Rev Oral Biol Med* 14 [3], pp. 199-212. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12799323](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12799323)
- [241] Cooper, J. S.; Fu, K.; Marks, J. and Silverman, S. (1995): Late effects of radiation therapy in the head and neck region, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31 [5], pp.

- 1141-64. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7713779](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7713779)
- [242] Mosqueda-Taylor, A.; Luna-Ortiz, K.; Irigoyen-Camacho, M. E.; Diaz-Franco, M. A. and Coll-Munoz, A. M. (2004): Effect of pilocarpine hydrochloride on salivary production in previously irradiated head and neck cancer patients, *Med Oral* 9 [3], pp. 204-11. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15122121](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15122121)
- [243] Wasserman, T. H.; Brizel, D. M.; Henke, M.; Monnier, A.; Eschwege, F.; Sauer, R. and Strnad, V. (2005): Influence of intravenous amifostine on xerostomia, tumor control, and survival after radiotherapy for head-and- neck cancer: 2-year follow-up of a prospective, randomized, phase III trial, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 63 [4], pp. 985-90. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16253773](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16253773)
- [244] Lombaert, I. M.; Brunsting, J. F.; Wierenga, P. K.; Faber, H.; Stokman, M. A.; Kok, T.; Visser, W. H.; Kampinga, H. H.; de Haan, G. and Coppes, R. P. (2008): Rescue of salivary gland function after stem cell transplantation in irradiated glands, *PLoS ONE* 3 [4], p. e2063. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18446241](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18446241)
- [245] Waite, K. A. and Eng, C. (2003): From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP/TGF-beta family, *Nat Rev Genet* 4 [10], pp. 763-73. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14526373](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14526373)
- [246] Shemen, L. J.; Huvos, A. G. and Spiro, R. H. (1987): Squamous cell carcinoma of salivary gland origin, *Head Neck Surg* 9 [4], pp. 235-40. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3667298](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3667298)
- [247] Whitman, M. (1998): Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily, *Genes Dev* 12 [16], pp. 2445-62. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9716398](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9716398)
- [248] Kim, J. S.; Crooks, H.; Dracheva, T.; Nishanian, T. G.; Singh, B.; Jen, J. and Waldman, T. (2002): Oncogenic beta-catenin is required for bone morphogenetic protein 4 expression in human cancer cells, *Cancer Res* 62 [10], pp. 2744-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12019147](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12019147)
- [249] Mishina, Y.; Hanks, M. C.; Miura, S.; Tallquist, M. D. and Behringer, R. R. (2002): Generation of Bmpr/Alk3 conditional knockout mice, *Genesis* 32 [2], pp. 69-72. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11857780](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11857780)
- [250] Chu, P. G. and Weiss, L. M. (2002): Keratin expression in human tissues and neoplasms, *Histopathology* 40 [5], pp. 403-39. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12010363](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12010363)
- [251] Lobe, C. G.; Koop, K. E.; Kreppner, W.; Lomeli, H.; Gertsenstein, M. and Nagy, A. (1999): Z/AP, a double reporter for cre-mediated recombination, *Dev Biol* 208

- [2], pp. 281-92. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10191045](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10191045)
- [252] Workman, J. L. and Kingston, R. E. (1998): Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation, *Annu Rev Biochem* 67, pp. 545-79. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9759497](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9759497)
- [253] Nicholson, D. W.; Ali, A.; Thornberry, N. A.; Vaillancourt, J. P.; Ding, C. K.; Gallant, M.; Gareau, Y.; Griffin, P. R.; Labelle, M.; Lazebnik, Y. A. and et al. (1995): Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis, *Nature* 376 [6535], pp. 37-43. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7596430](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7596430)
- [254] Wojcik, S. M.; Bundman, D. S. and Roop, D. R. (2000): Delayed wound healing in keratin 6a knockout mice, *Mol Cell Biol* 20 [14], pp. 5248-55. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10866680](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10866680)
- [255] Nagata, S. (1999): Fas ligand-induced apoptosis, *Annu Rev Genet* 33, pp. 29-55. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10690403](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10690403)
- [256] Yuspa, S. H.; Kilkenny, A. E.; Steinert, P. M. and Roop, D. R. (1989): Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro, *J Cell Biol* 109 [3], pp. 1207-17. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2475508](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2475508)
- [257] Hisatomi, Y.; Okumura, K.; Nakamura, K.; Matsumoto, S.; Satoh, A.; Nagano, K.; Yamamoto, T. and Endo, F. (2004): Flow cytometric isolation of endodermal progenitors from mouse salivary gland differentiate into hepatic and pancreatic lineages, *Hepatology* 39 [3], pp. 667-75. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14999685](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14999685)
- [258] Sagrinati, C.; Netti, G. S.; Mazzinghi, B.; Lazzeri, E.; Liotta, F.; Frosali, F.; Ronconi, E.; Meini, C.; Gacci, M.; Squecco, R.; Carini, M.; Gesualdo, L.; Francini, F.; Maggi, E.; Annunziato, F.; Lasagni, L.; Serio, M.; Romagnani, S. and Romagnani, P. (2006): Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys, *J Am Soc Nephrol* 17 [9], pp. 2443-56. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16885410](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16885410)
- [259] Shackleton, M.; Vaillant, F.; Simpson, K. J.; Stingl, J.; Smyth, G. K.; Asselin-Labat, M. L.; Wu, L.; Lindeman, G. J. and Visvader, J. E. (2006): Generation of a functional mammary gland from a single stem cell, *Nature* 439 [7072], pp. 84-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16397499](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16397499)
- [260] Stingl, J.; Eirew, P.; Ricketson, I.; Shackleton, M.; Vaillant, F.; Choi, D.; Li, H. I. and Eaves, C. J. (2006): Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells, *Nature* 439 [7079], pp. 993-7. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16395311](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16395311)
- [261] Wong, D. J.; Liu, H.; Ridky, T. W.; Cassarino, D.; Segal, E. and Chang, H. Y. (2008): Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells, *Cell Stem Cell* 2 [4], pp. 333-44. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18397753](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18397753)
- [262] Cui, L.; Johkura, K.; Yue, F.; Ogiwara, N.; Okouchi, Y.; Asanuma, K. and Sasaki, K. (2004): Spatial distribution and initial changes of SSEA-1 and other cell adhesion-related molecules on mouse embryonic stem cells before and during differentiation, *J Histochem Cytochem* 52 [11], pp. 1447-57. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15505339](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15505339)
- [263] Stadtfeld, M.; Maherali, N.; Breault, D. T. and Hochedlinger, K. (2008): Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse, *Cell Stem Cell* 2 [3], pp. 230-40. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18371448](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18371448)
- [264] Kim, S. K.; Suh, M. R.; Yoon, H. S.; Lee, J. B.; Oh, S. K.; Moon, S. Y.; Moon, S. H.; Lee, J. Y.; Hwang, J. H.; Cho, W. J. and Kim, K. S. (2005): Identification of developmental pluripotency associated 5 expression in human pluripotent stem cells, *Stem Cells* 23 [4], pp. 458-62. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15790765](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15790765)
- [265] Ware, C. B.; Wang, L.; Mecham, B. H.; Shen, L.; Nelson, A. M.; Bar, M.; Lamba, D. A.; Dauphin, D. S.; Buckingham, B.; Askari, B.; Lim, R.; Tewari, M.; Gartler, S. M.; Issa, J. P.; Pavlidis, P.; Duan, Z. and Blau, C. A. (2009): Histone deacetylase inhibition elicits an evolutionarily conserved self-renewal program in embryonic stem cells, *Cell Stem Cell* 4 [4], pp. 359-69. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19341625](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19341625)
- [266] Brabletz, T.; Jung, A.; Spaderna, S.; Hlubek, F. and Kirchner, T. (2005): Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression, *Nat Rev Cancer* 5 [9], pp. 744-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16148886](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16148886)
- [267] Emami, K. H.; Nguyen, C.; Ma, H.; Kim, D. H.; Jeong, K. W.; Eguchi, M.; Moon, R. T.; Teo, J. L.; Kim, H. Y.; Moon, S. H.; Ha, J. R. and Kahn, M. (2004): A small molecule inhibitor of beta-catenin/CREB-binding protein transcription [corrected], *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 [34], pp. 12682-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15314234](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15314234)
- [268] Sato, T.; Vries, R. G.; Snippert, H. J.; van de Wetering, M.; Barker, N.; Stange, D. E.; van Es, J. H.; Abo, A.; Kujala, P.; Peters, P. J. and Clevers, H. (2009): Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche, *Nature* 459 [7244], pp. 262-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19329995](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19329995)
- [269] Brinkmann, V.; Foroutan, H.; Sachs, M.; Weidner, K. M. and Birchmeier, W. (1995): Hepatocyte growth factor/scatter factor induces a variety of tissue-specific morphogenic programs in epithelial cells, *J Cell Biol* 131 [6 Pt 1], pp. 1573-86.

- URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8522613](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8522613)
- [270] Lustig, B.; Jerchow, B.; Sachs, M.; Weiler, S.; Pietsch, T.; Karsten, U.; van de Wetering M.; Clevers, H.; Schlag, P. M.; Birchmeier, W. and Behrens, J. (2002): Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors, *Mol.Cell Biol.* 22 [4], pp. 1184-1193. URL: PM:11809809
- [271] Jho, E. H.; Zhang, T.; Domon, C.; Joo, C. K.; Freund, J. N. and Costantini, F. (2002): Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway, *Mol Cell Biol* 22 [4], pp. 1172-83. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11809808](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11809808)
- [272] Soshnikova, N.; Zechner, D.; Huelsken, J.; Mishina, Y.; Behringer, R. R.; Taketo, M. M.; Crenshaw, E. B., III and Birchmeier, W. (2003): Genetic interaction between Wnt/beta-catenin and BMP receptor signaling during formation of the AER and the dorsal-ventral axis in the limb, *Genes Dev.* 17 [16], pp. 1963-1968. URL: PM:12923052
- [273] Aulehla, A.; Wehrle, C.; Brand-Saberi, B.; Kemler, R.; Gossler, A.; Kanzler, B. and Herrmann, B. G. (2003): Wnt3a plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis, *Dev.Cell* 4 [3], pp. 395-406. URL: PM:12636920
- [274] Yu, H. M.; Jerchow, B.; Sheu, T. J.; Liu, B.; Costantini, F.; Puzas, J. E.; Birchmeier, W. and Hsu, W. (2005): The role of Axin2 in calvarial morphogenesis and craniosynostosis, *Development* 132 [8], pp. 1995-2005. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15790973](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15790973)
- [275] Burford-Mason, A. P.; Cummins, M. M.; Brown, D. H.; MacKay, A. J. and Dardick, I. (1993): Immunohistochemical analysis of the proliferative capacity of duct and acinar cells during ligation-induced atrophy and subsequent regeneration of rat parotid gland, *J Oral Pathol Med* 22 [10], pp. 440-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7907370](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7907370)
- [276] Takahashi, S.; Nakamura, S.; Suzuki, R.; Islam, N.; Domon, T.; Yamamoto, T. and Wakita, M. (2000): Apoptosis and mitosis of parenchymal cells in the duct-ligated rat submandibular gland, *Tissue Cell* 32 [6], pp. 457-63. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11197228](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11197228)
- [277] Takahashi, S.; Schoch, E. and Walker, N. I. (1998): Origin of acinar cell regeneration after atrophy of the rat parotid induced by duct obstruction, *Int J Exp Pathol* 79 [5], pp. 293-301. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10193312](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10193312)
- [278] Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (2004): Cancer genes and the pathways they control, *Nat Med* 10 [8], pp. 789-99. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15286780](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15286780)
- [279] Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1996): Lessons from hereditary colorectal cancer, *Cell* 87 [2], pp. 159-170. URL: PM:8861899
- [280] Yang, S. H.; Andl, T.; Grachtchouk, V.; Wang, A.; Liu, J.; Syu, L. J.; Ferris, J.; Wang, T. S.; Glick, A. B.; Millar, S. E. and Dlugosz, A. A. (2008): Pathological



- responses to oncogenic Hedgehog signaling in skin are dependent on canonical Wnt/beta-catenin signaling, *Nat Genet* 40 [9], pp. 1130-5. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19165927](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19165927)
- [281] Piccirillo, S. G.; Reynolds, B. A.; Zanetti, N.; Lamorte, G.; Binda, E.; Broggi, G.; Brem, H.; Olivi, A.; Dimeco, F. and Vescovi, A. L. (2006): Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells, *Nature* 444 [7120], pp. 761-5. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17151667](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17151667)
- [282] Bouras, T.; Pal, B.; Vaillant, F.; Harburg, G.; Asselin-Labat, M. L.; Oakes, S. R.; Lindeman, G. J. and Visvader, J. E. (2008): Notch signaling regulates mammary stem cell function and luminal cell-fate commitment, *Cell Stem Cell* 3 [4], pp. 429-41. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18940734](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18940734)
- [283] Zhao, C.; Chen, A.; Jamieson, C. H.; Fereshteh, M.; Abrahamsson, A.; Blum, J.; Kwon, H. Y.; Kim, J.; Chute, J. P.; Rizzieri, D.; Munchhof, M.; VanArsdale, T.; Beachy, P. A. and Reya, T. (2009): Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia, *Nature* 458 [7239], pp. 776-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19169242](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19169242)
- [284] Gupta, R.; Vyas, P. and Enver, T. (2009): Molecular targeting of cancer stem cells, *Cell Stem Cell* 5 [2], pp. 125-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19664981](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19664981)
- [285] Huangfu, D.; Maehr, R.; Guo, W.; Eijkelenboom, A.; Snitow, M.; Chen, A. E. and Melton, D. A. (2008): Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds, *Nat Biotechnol* 26 [7], pp. 795-7. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18568017](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18568017)
- [286] Fausto, N.; Campbell, J. S. and Riehle, K. J. (2006): Liver regeneration, *Hepatology* 43 [2 Suppl 1], pp. S45-53. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16447274](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16447274)
- [287] Sekine, S.; Gutierrez, P. J.; Lan, B. Y.; Feng, S. and Hebrok, M. (2007): Liver-specific loss of beta-catenin results in delayed hepatocyte proliferation after partial hepatectomy, *Hepatology* 45 [2], pp. 361-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17256747](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17256747)
- [288] Tan, X.; Behari, J.; Cieply, B.; Michalopoulos, G. K. and Monga, S. P. (2006): Conditional deletion of beta-catenin reveals its role in liver growth and regeneration, *Gastroenterology* 131 [5], pp. 1561-72. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17101329](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17101329)
- [289] Scheving, L. A. and Russell, W. E. (2006): Beta-catenin in the liver: an integrator of proliferation and metabolism?, *Gastroenterology* 131 [5], pp. 1641-3. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17101334](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17101334)

- [290] Ito, M.; Yang, Z.; Andl, T.; Cui, C.; Kim, N.; Millar, S. E. and Cotsarelis, G. (2007): Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding, *Nature* 447 [7142], pp. 316-320. URL: PM:17507982
- [291] Tsuji, K.; Bandyopadhyay, A.; Harfe, B. D.; Cox, K.; Kakar, S.; Gerstenfeld, L.; Einhorn, T.; Tabin, C. J. and Rosen, V. (2006): BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing, *Nat Genet* 38 [12], pp. 1424-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17099713](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17099713)
- [292] Dean, D. B.; Watson, J. T.; Moed, B. R. and Zhang, Z. (2009): Role of bone morphogenetic proteins and their antagonists in healing of bone fracture, *Front Biosci* 14, pp. 2878-88. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19273241](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19273241)
- [293] Haynes, T.; Gutierrez, C.; Aycinena, J. C.; Tsonis, P. A. and Del Rio-Tsonis, K. (2007): BMP signaling mediates stem/progenitor cell-induced retina regeneration, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 [51], pp. 20380-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18093961](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18093961)
- [294] Niderfors, T. (2000): Xerostomia and hyposalivation, *Adv Dent Res* 14, pp. 48-56. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11842923](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11842923)
- [295] Lombaert, I. M.; Brunsting, J. F.; Wierenga, P. K.; Kampinga, H. H.; de Haan, G. and Coppes, R. P. (2008): Keratinocyte growth factor prevents radiation damage to salivary glands by expansion of the stem/progenitor pool, *Stem Cells* 26 [10], pp. 2595-601. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18669914](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18669914)
- [296] Okumura, K.; Nakamura, K.; Hisatomi, Y.; Nagano, K.; Tanaka, Y.; Terada, K.; Sugiyama, T.; Umeyama, K.; Matsumoto, K.; Yamamoto, T. and Endo, F. (2003): Salivary gland progenitor cells induced by duct ligation differentiate into hepatic and pancreatic lineages, *Hepatology* 38 [1], pp. 104-13. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12829992](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12829992)
- [297] Dvorak, H. F. (1986): Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing, *N Engl J Med* 315 [26], pp. 1650-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3537791](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3537791)
- [298] Sambrook, E.F.; Fritsch, E.F. and Maniatis, E. (1989): *Molecular cloning: a laboratory handbook.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [299] Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, I.G.; Smith, J.A. and Struhl, K. (1987): *Current protocols in molecular biology.*, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
- [300] Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science* 239 [4839], pp. 487-91. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2448875](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2448875)

- 
- [301] Romeis, B. and Boeck, P. (2001): Mikroskopische Technik, Urban & Schwarzenberg 17. Auflage.



## Publikationsliste

Wend P., Loddenkemper C., Brinkmann V., Eckert K., Taketo M. M., Kahn M., Ziebold U., Birchmeier W. Wnt/ $\beta$ -catenin activity is essential in altering the epigenetic state of salivary gland stem cells to create cancer stem cells. Manuskript eingereicht.

Chirasani S.R., Sternjak A., Wend P., Momma S., Herold-Mende C., Besser D., Synowitz M., Kettenmann H. Glass R. Bone morphogenetic protein-7 release from endogenous neural precursor cells suppresses the tumorigenicity of glioma stem cells. Manuskript angenommen (Brain).

Grigoryan T., Wend P., Klaus A., Birchmeier W. Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. Genes Dev. 2008 Sep 1;22(17):2308-41.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen herzlich danken, die zur Entstehung dieser Arbeit im Großen und im Kleinen beigetragen haben. Mein erster Dank gilt Prof. Walter Birchmeier. Er ermöglichte mir die Bearbeitung des spannenden Projektes, war stets engagiert und interessiert, Ergebnisse zu diskutieren und vermittelte mir viele interessante Erfahrungen aus seinem Wissenschaftlerleben. Ein ganz großes Dankeschön gilt auch Dr. Ulrike Ziebold. Durch ihre Betreuung, Ideen und Diskussionen gab sie mir sehr wertvolle Unterstützung für mein wissenschaftliches Arbeiten. Mein herzlicher Dank gilt ebenso allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Walter Birchmeier, AG Ulrike Ziebold und AG Daniel Besser für ihre Hilfe, Unterstützung und das produktive Arbeitsklima. Mein Dank geht auch an Dr. Hans-Peter Rahn von der MDC-FACS-Einheit, Dagmar Gerhard vom MDC-Tierhaus, Dr. Klaus Eckert vom MDC, Prof. Christoph Loddenkemper vom CBF der Charité und Dr. Volker Brinkmann vom MPI für Infektionsbiologie in Berlin, durch die das umfangreiche Projekt mit vorangebracht wurde.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich stets umfassend unterstützt und mir diesen Weg ermöglicht hat. Und ich freue mich, ihnen den Unterschied zwischen Wald- und Wiesenmaus und meinen Labormäusen beigebracht zu haben! Nicht zuletzt gilt der größte und herzlichste Dank meiner besseren Hälfte, Korinna Wend, für ihre Liebe und Unterstützung während des Studiums und der Promotionszeit.

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel erarbeitet und verfasst habe. Alle aus anderen Quellen oder indirekt übernommene Daten sind unter Angabe der Referenz gekennzeichnet. Diese Arbeit wurde keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, den 15.12.2009

Peter Wend